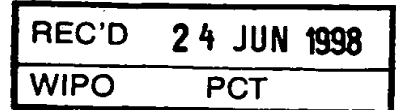


99/403627
PCT/FR 98/00923



BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

PRIORITY DOCUMENT

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le **03 JUIN 1998**

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département

Martine PLANCHE

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

SIÈGE
25 bis, rue de Saint Petersburg
75300 PARIS Cedex 08
Téléphone 01 53 04 53 04
Télécopie 01 42 93 59 30



REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

Confirmation d'un dépôt par télécopie ☐

Cet imprimé est à remplir à l'encre noire en lettres capitales

DATE DE REMISE DES PIÈCES **7.05.1997**
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL **97 05677-**
DÉPARTEMENT DE DÉPÔT **75**
DATE DE DÉPÔT **07 MAI 1997**

1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE
À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE

GROSSET-FOURNIER & DEMACHY SARL
103, rue La Fayette
F-75010 PARIS

2 DEMANDE Nature du titre de propriété industrielle

☒ brevet d'invention ☐ demande divisionnaire

☐ certificat d'utilité ☐ transformation d'une demande de brevet européen

☒ demande initiale
☒ brevet d'invention

n° du pouvoir permanent : références du correspondant : IFB97AE CNR IMM 01.42.81.09.58
téléphone : date

Établissement du rapport de recherche

☐ différé ☒ immédiat

Le demandeur, personne physique, requiert le paiement échelonné de la redevance

☐ oui ☐ non

Titre de l'invention (200 caractères maximum)

"ANALOGUES PEPTIDIQUES, ET LEURS UTILISATIONS
SURTOUT DANS DES COMPOSITIONS PHARMACEUTIQUES ET POUR LE DIAGNOSTIC".

3 DEMANDEUR (S)

n° SIREN

code APE-NAF

Forme juridique

Nom et prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination

- 1) CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
- 2) INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE

Nationalité (s) 1) FRANCAISE 2) FRANCAISE

Adresse (s) complète (s)

Pays

- 1) 3, rue Michel-Ange
F-75794 PARIS CEDEX 16
- 2) 101, rue de Tolbiac
F-75654 PARIS CEDEX 13

1) FRANCE

2) FRANCE

En cas d'insuffisance de place, poursuivre sur papier libre ☐

4 INVENTEUR (S) Les inventeurs sont les demandeurs

☐ oui ☒ non

Si la réponse est non, fournir une désignation séparée

5 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES

☐ requise pour la 1ère fois

☐ requise antérieurement au dépôt : joindre copie de la décision d'admission

6 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE

pays d'origine

numéro

date de dépôt

nature de la demande

7 DIVISIONS antérieures à la présente demande n°

date

n°

date

8 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE

(nom et qualité du signataire - n° d'inscription)

Charles DEMACHY (422.5/PP.170), Co-Gérant
GROSSET-FOURNIER & DEMACHY SARL

SIGNATURE DU PRÉPOSÉ À LA RÉCEPTION

SIGNATURE APRES ENREGISTREMENT DE LA DEMANDE À L'INPI



BREVET D'INVENTION / CERTIFICAT D'UTILITE

DÉSIGNATION DE L'INVENTEUR

(si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

IFB97AE CNR IMM

DIVISION ADMINISTRATIVE DES BREVETS

26bis, rue de Saint-Petersbourg

75800 Paris Cédex 08

Tél. : 01 53 04 53 04 - Télécopie : 01 42 93 59 30

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

97 05677

TITRE DE L'INVENTION :

"ANALOGUES PEPTIDIQUES, ET LEURS UTILISATIONS NOTAMMENT DANS DES COMPOSITIONS PHARMACEUTIQUES ET POUR LE DIAGNOSTIC".

LE(S) SOUSSIGNÉ(S)

Charles DEMACHY
GROSSET-FOURNIER & DEMACHY SARL
103, rue La Fayette
F-75010 PARIS

DÉSIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) (indiquer nom, prénoms, adresse et souligner le nom patronymique) :

1) GUILLET Jean-Gérard
39, rue Raphaël
F-92170 VANVES
FRANCE

2) GUICHARD Gilles
6, quai Matthis
F-67000 STRASBOURG
FRANCE

3) OSTANKOVITCH Marina
89, rue Broca
F-75013 PARIS
FRANCE

4) CONNAN Francine
21, rue du Progrès
F-95170 DEUIL-LA-BARRE
FRANCE

5) QUESNEL Anne
13A, boulevard de Lyon
F-67000 STRASBOURG
FRANCE

6) CHOPPIN Jeannine
8, rue Saint Fiacre
F-51100 REIMS
FRANCE

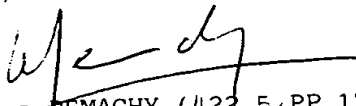
7) BRIAND Jean-Paul
22, rue des Balayeurs
F-67000 STRASBOURG
FRANCE

8) MULLER Sylviane
15, avenue de la Forêt Noire
F-67000 STRASBOURG
FRANCE

NOTA : A titre exceptionnel, le nom de l'inventeur peut être suivi de celui de la société à laquelle il appartient (société d'appartenance) lorsque celle-ci est différente de la société déposante ou titulaire.

Date et signature (s) du (des) demandeur (s) ou du mandataire

Paris, le 15 janvier 1998


Charles DEMACHY (422.5, PP.170)
Co-Gérant GROSSET-FOURNIER & DEMACHY SARL

DOCUMENT COMPORTANT DES MODIFICATIONS

PAGE(S) DE LA DESCRIPTION OU DES REVENDI- CATIONS OU PLANCHE(S) DE DESSIN			R.M.*	DATE DE LA CORRESPONDANCE	TAMPON DATEUR DU CORRECTEUR
Modifiée(s)	Supprimée(s)	Ajoutée(s)			
48 et 57			X	15.08.92	08 OCT. 1997 - SR

Un changement apporté à la rédaction des revendications d'origine, sauf si celui-ci découle des dispositions de l'article 28 du décret du 19 septembre 1979, est signalé par la mention "R.M." (revendications modifiées).

ANALOGUES PEPTIDIQUES ET LEURS UTILISATIONS NOTAMMENT DANS DES COMPOSITIONS PHARMACEUTIQUES ET POUR LE DIAGNOSTIC

5 La présente invention a pour objet des analogues peptidiques et leurs utilisations, principalement dans le domaine de la préparation de compositions pharmaceutiques, notamment de vaccins, et pour le diagnostic *in vitro* ou *in vivo* de diverses pathologies.

10 Le développement des neuropeptides, des hormones peptidiques et des antibiotiques à base de peptides, ou des vaccins synthétiques à base de peptides, est fortement perturbé par la grande sensibilité des peptides vis à vis de la protéolyse qui limite, entre autres, l'administration orale et parentérale.

15 Les pseudopeptides représentent une classe de molécules particulièrement intéressante dans la conception d'inhibiteurs d'enzymes. Le clivage par les peptidases est impliqué dans une variété de processus biologiques puisqu'il permet de générer à partir de précurseurs inactifs des fragments protéiques ou peptidiques actifs. L'idée qu'un lien isostère pouvait être considéré comme un mime de l'intermédiaire tétraédrique formé lors du passage par l'état de transition, a ouvert la voie des inhibiteurs de type pseudopeptidiques. Au début des années 80, cette
20 approche a été utilisée avec succès dans le développement d'inhibiteurs puissants de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE), de la rénine (Szelke *et al.*, 1982 ; Boger *et al.*, 1983) et de la protéase aspartique du VIH (Huff, 1991). Plus récemment, plusieurs inhibiteurs pseudopeptidiques sélectifs de la Ras farnesyl transférase ont été proposés. Ces molécules présentent un intérêt thérapeutique
25 potentiel dans le traitement des cancers impliquant l'oncogène Ras muté (Buss & Marsters, 1995).

30 Les analogues pseudopeptidiques d'hormones peptidiques ont également fait l'objet de nombreuses études avec pour objectif premier la stabilisation du peptide de départ et une conservation de l'activité. Cette stratégie a effectivement permis la découverte d'agonistes puissants (Chorev *et al.*, 1979 ; Nagain *et al.*, 1988 ; Doulut *et al.*, 1992), mais aussi d'agonistes partiels et même d'antagonistes de l'hormone étudiée (Martinez *et al.*, 1985 ; Coy *et al.*, 1989 ; Leban *et al.*, 1993 ; Cai *et al.*, 1994). Des analogues plus sélectifs au niveau d'un récepteur ont aussi
35 été obtenus dans certains cas (Mendre, 1988 ; Nagain *et al.*, 1988 ; Schiller *et al.*, 1993). Par ailleurs, la liaison pseudopeptidique permet d'explorer les caractéristiques conformationnelles du ligand au niveau du site modifié et, d'évaluer la contribution de la liaison amide et des liaisons hydrogènes inter- ou intramoléculaires dans l'interaction avec le ou les récepteurs.

Toutefois, les modifications effectuées jusqu'à présent sur les peptides à usage immunologique se limitent essentiellement à l'adjonction de sucres, à celle d'acides gras plus ou moins longs pour permettre l'émulsion des lipopeptides résultants, à la cyclisation par formation de ponts disulfure ou covalents, ainsi qu'à l'adjonction de molécules telles que la biotine, pour augmenter, par exemple, la sensibilité des tests immunochimiques en phase solide.

Plusieurs auteurs ont affirmé que les pseudopeptides possèdent probablement très peu ou pas d'immunogénicité, puisqu'ils ne pouvaient pas être transformés et présentés aux molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) pour être reconnus par les cellules T auxiliaires ou par les lymphocytes T cytotoxiques. C'est ainsi que Dintzis *et al.* ont décrit que l'énantiomère L de la rubrexodine induit une forte réponse immunitaire par production d'immunoglobulines d'isotype G (IgG), tandis que la protéine correspondante constituée d'acides aminés tous de configuration D, n'induit pas de réponse immunitaire.

C'est dans ce contexte que les immunorétroïdes décrits ci-après, ainsi que les anticorps dirigés contre ces derniers, ont été décrits dans la demande internationale WO 95/24916, comme étant utilisables dans le domaine de la vaccination contre des pathologies dans lesquelles les peptides dont ils dérivent (peptides parents) étaient impliqués, ainsi que pour le diagnostic de ces pathologies.

Les auteurs de cette demande internationale, qui sont également les auteurs de la présente demande, avaient en effet, pour la première fois, mis en évidence que la modification par remplacement d'une liaison peptidique -CO-NH- de la chaîne peptidique d'un peptide, par une liaison -NH-CO-, et, le cas échéant par remplacement d'un acide aminé de configuration L par un acide aminé de configuration D, permet d'obtenir des analogues peptidiques (rétro ou rétro-inverso respectivement) susceptibles d'être utilisés dans le cadre du traitement de pathologies impliquant la réponse immunitaire à médiation humorale ou cellulaire.

Les immunorétroïdes susmentionnés sont des composés du type peptidique, à savoir des composés constitués d'une chaîne d'acides aminés protéinogéniques, dont l'une au moins des liaisons -CO-NH-, et avantageusement toutes les liaisons -CO-NH-, de la chaîne peptidique du peptide parent correspondant, (ne comportant pas de liaison -NH-CO- dans sa chaîne peptidique), est (sont) remplacée(s) par une (des) liaison(s) -NH-CO-, la chiralité de chaque résidu aminoacyle, qu'il soit impliqué ou non dans une ou plusieurs liaisons -NH-CO- susmentionnées, étant soit conservée (peptide rétro), soit inversée (peptide rétro-inverso) par rapport aux résidus aminoacyles correspondants constituant ledit peptide parent.

Par peptides rétro-inverso, il faut entendre tout peptide et analogue peptidique répondant à la définition donnée ci-dessus des immunorétroïdes, ledit peptide étant plus particulièrement constitué d'une chaîne peptidique dans laquelle

l'un au moins des résidus d'une part est lié à au moins un résidu voisin par une liaison -NH-CO-, et d'autre part, est de chiralité opposée à celle de ce même résidu aminoacyle dans la chaîne peptidique du peptide parent.

5 Par peptide rétro, il faut entendre tout peptide répondant à la définition donnée ci-dessus des immunorétroïdes, ledit peptide étant plus particulièrement constitué d'une chaîne peptidique dans laquelle l'un au moins des résidus, est lié à au moins un résidu voisin par une liaison -NH-CO-, la chiralité de la totalité des résidus aminoacyles impliqués dans au moins une liaison -NH-CO- étant conservée par rapport au résidu correspondant de la chaîne peptidique du peptide parent.

10 Il va de soi que les liaisons -CO-NH- et -NH-CO- doivent être prises en compte dans ce qui précède et ce qui suit, dans le sens de la chaîne peptidique parente allant de l'extrémité aminoterminal (N-terminale) vers l'extrémité carboxyterminale (C-terminale).

15 Compte tenu du contexte général d'incertitude sur l'efficacité des analogues peptidiques rappelé ci-dessus, les auteurs de cette demande internationale WO95/24916 avaient considéré que cette inversion du sens de la liaison amide entre les acides aminés protéinogéniques, et/ou la modification de la configuration des acides aminés protéinogéniques, représentaient les seules modifications possibles des peptides parents pour obtenir des analogues peptidiques présentant
20 une demi-vie supérieure, et des propriétés biologiques, notamment immunologiques, comparables, voire supérieures, à celles des peptides parents susmentionnés.

Or, la présente invention découle de la découverte faite par les auteurs de la présente demande que, contrairement à ce qu'ils avaient cru bon de déduire dans le
25 cadre de leur invention précédente en raison du contexte général rappelé ci-dessus, ces modifications du type rétro ou rétro-inverso de la chaîne peptidique des peptides parents, ne représentent pas les seules modifications possibles permettant d'obtenir des analogues peptidiques d'intérêt, du moins dans le cadre du diagnostic et/ou du traitement de pathologies impliquant la réponse immunitaire à médiation
30 cellulaire.

En effet, les auteurs de la présente demande ont mis en évidence que la modification de peptides naturels impliqués dans des pathologies dans lesquelles intervient l'immunité à médiation cellulaire, par remplacement des liaisons peptidiques -CO-NH- de la chaîne peptidique desdits peptides naturels par d'autres
35 liaisons encore que la liaison -NH-CO-, et/ou par remplacement des acides aminés protéinogéniques du peptide naturel par des acides aminés non protéinogéniques, permet d'obtenir des analogues peptidiques desdits peptides naturels pouvant être utilisés avec les avantages susmentionnés dans le cadre du traitement ou du diagnostic desdites pathologies.

Par "acide aminé protéinogénique", on entend, dans ce qui précède et ce qui suit, tout acide aminé entrant dans la constitution d'une protéine ou d'un peptide naturel.

5 Par "acide aminé non protéinogénique", on entend par opposition à la définition précédente, tout acide aminé n'entrant pas dans la constitution d'une protéine ou d'un peptide naturel. On entend plus particulièrement par "acide aminé non protéinogénique", tout acide aminé dont le carbone portant la chaîne latérale R, à savoir le groupe -CHR-, situé entre -CO- et -NH- dans la chaîne peptidique naturelle, est remplacé par un motif n'entrant pas dans la constitution d'une
10 protéine ou d'un peptide naturel.

La présente invention a pour but de fournir des compositions pharmaceutiques, et plus particulièrement des vaccins, comprenant des analogues peptidiques présentant une demi vie nettement supérieure à celle des peptides naturels ou des protéines naturelles, ou à celle des peptides de synthèse issus ou
15 non de ces protéines naturelles (ces protéines naturelles, ou peptides issus ou non de ces dernières, étant encore désignés dans ce qui suit par l'expression "protéines ou peptides parents"), dont ils sont les analogues, tout en présentant une activité biologique, et plus particulièrement immunologique, comparable, voire même supérieure, à celle des protéines ou peptides parents susmentionnés, ou encore une
20 activité différente ou opposée à celle desdites protéines ou peptides parents.

Un autre but de la présente invention est de fournir des méthodes de diagnostic *in vivo* ou encore d'évaluation *in vivo* de la capacité de la réponse immunitaire d'un individu dans le cadre de pathologies dans lesquelles des peptides naturels ou protéines naturelles (exogènes ou endogènes) sont susceptibles
25 d'intervenir en se liant aux molécules de CMH et, le cas échéant, aux récepteurs reconnaissant lesdits peptides naturels ou protéines naturelles et situés sur les cellules T.

L'invention a également pour but de fournir des compositions et des trousse (ou kits) pour la mise en oeuvre des méthodes de diagnostic ou d'évaluation *in vivo* de la réponse immunitaire susmentionnées.
30

La présente invention a également pour but de fournir des méthodes de diagnostic *in vitro* de pathologies associées à la présence dans l'organisme d'un individu de protéines endogènes ou exogènes, ces méthodes étant réalisées à l'aide des analogues peptidiques tels que définis ci-dessus, ou à l'aide d'anticorps dirigés
35 contre les complexes entre ces anticorps et les molécules de CMH, et présentant l'avantage d'être plus performantes que les méthodes de diagnostic actuelles réalisées à l'aide des peptides ou protéines parents, ou à l'aide d'anticorps dirigés contre ces derniers.

La présente invention a également pour but de fournir de nouveaux kits pour la mise en oeuvre de telles méthodes de diagnostic *in vitro*.

La présente invention a pour objet l'utilisation d'analogues peptidiques de peptides parents, ces peptides parents étant le cas échéant issus de protéines exogènes ou endogènes, lesdits peptides parents pouvant interagir avec des molécules du CMH dans le cadre de pathologies chez l'homme ou l'animal, lesdits analogues étant caractérisés en ce qu'ils correspondent auxdits peptides parents dans lesquels :

- au moins une liaison peptidique -CO-NH- de la chaîne peptidique, est modifiée, à l'exception des modifications du type rétro, ou rétro-inverso, ou
- au moins un acide aminé de la chaîne peptidique, est substitué par un acide aminé non protéinogénique, ou

- au moins une liaison peptidique -CO-NH- de la chaîne peptidique, est modifiée, et au moins un acide aminé de ladite chaîne peptidique est substitué par un acide non protéinogénique,

pour :

- la préparation d'un médicament destiné à la prévention ou au traitement des pathologies susmentionnées, ou

- la préparation d'une composition destinée au diagnostic *in vivo* des pathologies susmentionnées, ou à l'évaluation *in vivo* de la réponse immunitaire dans le cadre des pathologies susmentionnées, par mise en oeuvre d'une réaction cutanée d'hypersensibilité par injection intradermique de ladite composition, ou

- la mise en oeuvre d'une méthode de diagnostic *in vitro* desdites pathologies.

Comme nous l'avons déjà vu précédemment, il faut entendre par l'expression "peptide parent" susmentionnée,

- soit un peptide existant tel quel à l'état naturel, notamment dans un micro-organisme ou dans un organisme supérieur (notamment dans l'organisme humain),

- soit tout peptide d'intérêt immunologique obtenu par synthèse peptidique, à partir d'acides aminés protéinogéniques,

- soit un peptide issu d'une protéine telle qu'elle existe à l'état naturel dans les organismes susmentionnés, notamment par fragmentation de ladite protéine (notamment à l'aide de protéases appropriées, puis purification du peptide en question), ou par synthèse peptidique (selon les méthodes classiquement utilisées dans ce domaine)

- soit un peptide issu d'une protéine telle qu'elle existe à l'état naturel mais dont l'activité immunologique a été modifiée, conservée ou optimisée par remplacement de certains amino acides de la séquence naturelle par des acides

aminés protéinogéniques, par exemple à la suite d'un criblage d'une librairie de peptides analogues obtenue par synthèse peptidique.

L'invention a également pour objet les analogues peptidiques de peptides parents, ces peptides parents étant le cas échéant issus de protéines exogènes ou endogènes, lesdits peptides parents pouvant interagir avec des molécules du CMH dans le cadre de pathologies chez l'homme ou l'animal, lesdits analogues étant caractérisés en ce qu'ils correspondent auxdits peptides parents dans lesquels :

- au moins une liaison peptidique -CO-NH- de la chaîne peptidique est modifiée, à l'exception des modifications du type rétro, ou rétro-inverso, ou

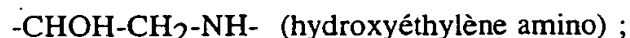
- au moins un acide aminé de la chaîne peptidique, est substitué par un acide aminé non protéinogénique, ou

- au moins une liaison peptidique -CO-NH- de la chaîne peptidique, est modifiée, et au moins un acide aminé de la chaîne peptidique, est substitué par un acide non protéinogénique.

Avantageusement, les analogues peptidiques susmentionnés de l'invention sont caractérisés en ce que le nombre de résidus aminoacyles protéinogéniques ou non, et reliés par une liaison modifiée ou non, est compris entre environ 5 et environ 20, de préférence entre 8 et 12 pour les analogues peptidiques se liant aux molécules du CMH de classe I, et de préférence entre 8 et 16 pour les analogues peptidiques se liant aux molécules du CMH de classe II.

L'invention a plus particulièrement pour objet les analogues peptidiques tels que décrits ci-dessus, caractérisés en ce que l'une au moins des liaisons peptidiques -CO-NH- de la chaîne peptidique du peptide parent est remplacée par une liaison différente de la liaison -CO-NH- , ladite liaison différente étant notamment choisie parmi les suivantes :

- $\text{-CH}_2\text{-NH-}$ (méthylène amino) ;
- $\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$ (carba) ;
- $\text{-CO-CH}_2\text{-}$ (cétométhylène) ;
- $\text{-CH}_2\text{-O-}$ (méthylène-oxy) ;
- $\text{-CHOH-CH}_2\text{-}$ (hydroxyéthylène) ;
- -CHOH-CHOH- (di-hydroxyéthylène) ;
- -CH=CH- (E ou Z oléfine) ;
- -CHCN-NH- (cyanométhylène amino) ;
- $\text{-S-CH}_2\text{-}$ (thiométhylène) ;
- $\text{-CH}_2\text{-S-}$ (méthylène thio) ;
- -CS-NH- (thioamide) ;
- $\text{-PO}_2\text{-NH-}$ (phosphonamide) ;
- -CHOH- (hydroxyméthylène) ;
- -NH-CO-NH- (urée) ;



L'invention a également pour objet les analogues peptidiques tels que décrits ci-dessus, et caractérisés en ce que l'une au moins des liaisons peptidiques -CO-NH- de la chaîne peptidique du peptide parent est remplacée par une liaison du type rétro ou rétro-inverso telle que définie ci-dessus, dans le cas où l'un au moins des acides aminés dudit analogue peptidique est un acide aminé non protéinogénique.

Des analogues peptidiques préférés dans le cadre de la présente invention sont caractérisés en ce que l'une au moins des liaisons peptidiques -CO-NH- de la chaîne peptidique ou peptide parent est remplacée par une liaison méthylène amino, ou du type β -homologation, ou carba, ou cétométhylène, ou cyanométhylène amino, ou hydroxyéthylène amino.

L'invention a plus particulièrement pour objet les analogues peptidiques du peptide parent Mart-1 27-35 du mélanome, comportant une liaison méthylène amino et répondant aux formules suivantes :

25

		Séquences								
		P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9
30	MART1 27-35	H- A	- A	- G	- I	- G	- I	- L	- T	- V -OH
	$\Psi(1-2)$	H- A	$\Psi(\text{CH}_2\text{NH})$ A	- G	- I	- G	- I	- L	- T	- V -OH
	$\Psi(2-3)$	H- A	- A	$\Psi(\text{CH}_2\text{NH})$ G	- I	- G	- I	- L	- T	- V -OH
	$\Psi(3-4)$	H- A	- A	- G	$\Psi(\text{CH}_2\text{NH})$ I	- G	- I	- L	- T	- V -OH
	$\Psi(4-5)$	H- A	- A	- G	- I	$\Psi(\text{CH}_2\text{NH})$ G	- I	- L	- T	- V -OH
	$\Psi(5-6)$	H- A	- A	- G	- I	- G	$\Psi(\text{CH}_2\text{NH})$ I	- L	- T	- V -OH
	$\Psi(6-7)$	H- A	- A	- G	- I	- G	- I	$\Psi(\text{CH}_2\text{NH})$ L	- T	- V -OH
	$\Psi(7-8)$	H- A	- A	- G	- I	- G	- I	- L	$\Psi(\text{CH}_2\text{NH})$ T	- V -OH
	$\Psi(8-9)$	H- A	- A	- G	- I	- G	- I	- L	- T	$\Psi(\text{CH}_2\text{NH})$ V -OH

35

Ces analogues peptidiques ψ (1-2), ψ (2-3), ψ (3-4), ψ (4-5), ψ (5-6), ψ (6-7), ψ (7-8) et ψ (8-9), encore désignés peptides réduits analogues de Mart-1 27-35, correspondent à ce dernier peptide dans lequel la liaison -CO-NH- située entre les résidus P1 et P2, P2 et P3, P3 et P4, P4 et P5, P5 et P6, P6 et P7, P7 et P8, P8 et P9 est remplacée respectivement par une liaison -CH₂-NH-.

L'invention a également pour objet les analogues peptidiques du peptide parent Mart-1 27-35 du mélanome, comportant une liaison du type β -homologation et répondant aux formules suivantes :

10

		Séquences								
		P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9
	MART1 27-35	H- A	- A	- G	- I	- G	- I	- L	- T	- V -OH
15	β 1	H- β -homoA	-A-	G-	I-	G-	I-	L-	T-	V -OH
	β 2	H- A-	β -homoA-	G-	I-	G-	I-	L-	T-	V -OH
	β 3	H- A	- A	β -homoG-	I-	G-	I-	L-	T-	V -OH
	β 4	H- A	- A	- G	β -homoI-	G-	I-	L-	T-	V -OH
	β 5	H- A	- A	- G	- I	β -homoG-	I-	L-	T-	V -OH
	β 6	H- A	- A	- G	- I	- G	β -homoI-	L-	T-	V -OH
20	β 7	H- A	- A	- G	- I	- G	- I	β -homoL-	T-	V -OH
	β 8	H- A	- A	- G	- I	- G	- I	- L	β -homoT-	V -OH
	β 9	H- A	- A	- G	- I	- G	- I	- L	- T	β -homoV -OH

25

Ces analogues peptidiques β 1 à β 9 de Mart-1 27-35 correspondent à ce dernier peptide dans lequel la liaison -CO-NH- située entre les résidus P1 et P2, P2 et P3, P3 et P4, P4 et P5, P5 et P6, P6 et P7, P7 et P8, P8 et P9, est remplacée respectivement par une liaison -CH₂-CO-NH-.

30

L'invention a également pour objet les analogues peptidiques du peptide parent muté Mart-1 27-35 Leu²⁸, correspondant au peptide Mart-1 27-35 dans lequel l'alanine en position 28 est remplacée par la leucine, et comportant une liaison du type β -homologation entre les mêmes résidus que dans le cas décrit ci-dessus des analogues peptidiques β 1 à β 9.

35

L'invention a plus particulièrement pour objet les analogues peptidiques du peptide parent M58-66 du virus de la grippe, comportant une liaison méthylène amino et répondant aux formules suivantes :

20

25

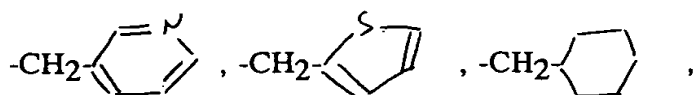
30

35

- $$R_1 - \underset{\text{H}}{\text{N}} - \overset{R_2}{\text{C}} - \underset{\text{D}}{\text{C}} \begin{matrix} \text{R}_3 \\ \text{OH} \end{matrix}$$

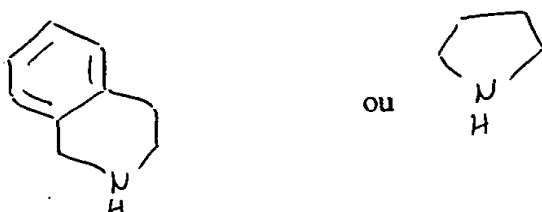
dans laquelle :

- R_1 , R_2 et R_3 , représentent indépendamment les uns des autres : un atome d'hydrogène, un hydroxyle, un radical alkyle de 1 à 25 atomes de carbone, un radical contenant un groupe allyle et ayant de 3 à 25 atomes de carbone, un radical contenant un ou plusieurs cycles aromatiques ou non, notamment un groupe aryle, et ayant de 6 à 25 atomes de carbone, et notamment les groupes suivants : $-\text{CH}_3$ (méthyl), $-\text{CH}_2\text{CH}_3$ (éthyl), $-(\text{CH}_2)_4-\text{CH}_3$, $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ (isopropyl), $-\text{C}(\text{CH}_3)_3$ (tertiobutyl), $-\Phi$ (phényl), $-\text{CH}_2\Phi$ (benzyl), $-\text{CH}_2\Phi\text{Cl}$ (para-chlorobenzyl), $-\text{CH}_2-\text{CH}_2\Phi$ (2-phényl-éthyl), $-\text{CH}_2\text{CHCH}_2$ (alkyl), méthylfluorényl, $-\text{CH}_2\text{CONH}_2$ (glycolamide), $-\text{CH}_2\text{CON}\Phi_2$ (benzhydrylglycolamide), $-\text{CHOH}\Phi$,

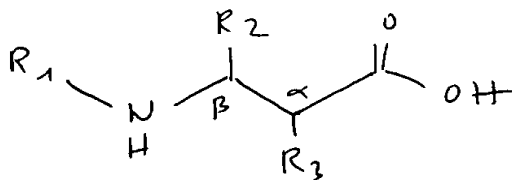


étant entendu que l'un des deux groupes R_2 et R_3 peuvent représenter une chaîne latérale d'acides aminés naturels lorsque soit R_1 , soit l'autre des deux groupes R_2 et R_3 ne représentent pas un atome d'hydrogène,

- le cas échéant, R_1 , R_2 , $\text{C}\alpha$ et N forment un hétérocycle de 4 à 8 atomes de carbone, aromatique ou non, le cas échéant substitué, notamment un hétérocycle de formule :

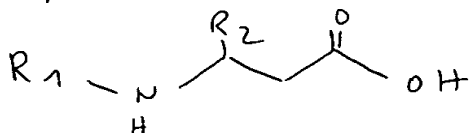


- les acides β -aminés de formule générale :

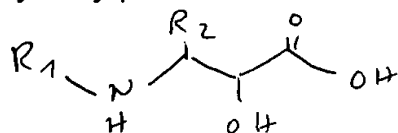


dans laquelle R_1 , R_2 et R_3 , indépendamment les uns des autres représentent une chaîne latérale d'un acide aminé naturel, ou sont tels que définis ci-dessus, notamment :

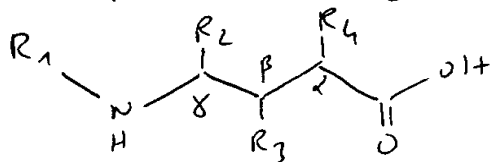
- les β -homo amino acides de formule :



dans laquelle R_1 et R_2 , sont tels que définis ci-dessus, ou
 les α -hydroxy β -homo amino acides de formule :

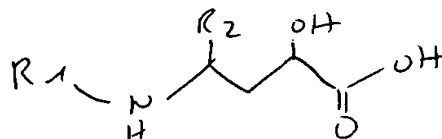


dans laquelle R_1 et R_2 , sont tels que définis ci-dessus,
 - les acides γ -aminés de formule générale :



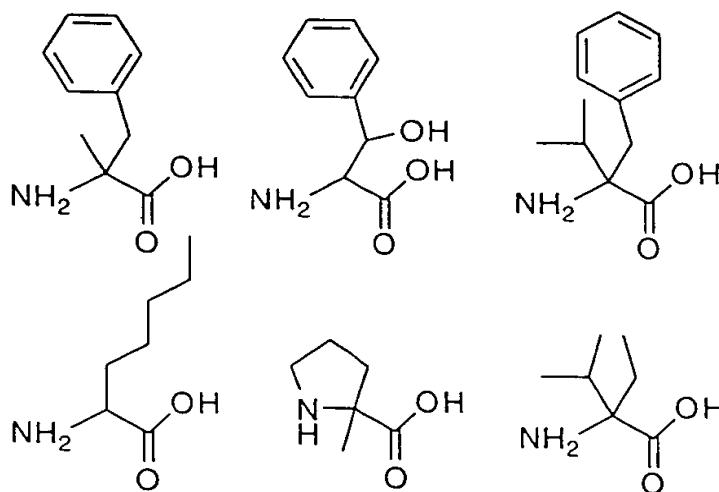
dans laquelle R_1 , R_2 , R_3 et R_4 représentent indépendamment les uns des
 autres une chaîne latérale d'un acide aminé naturel, ou R_1 , R_2 et R_3 , sont tels que
 définis ci-dessus, et R_4 a la même signification que celle donnée ci-dessus pour
 R_1 , R_2 et R_3 ,

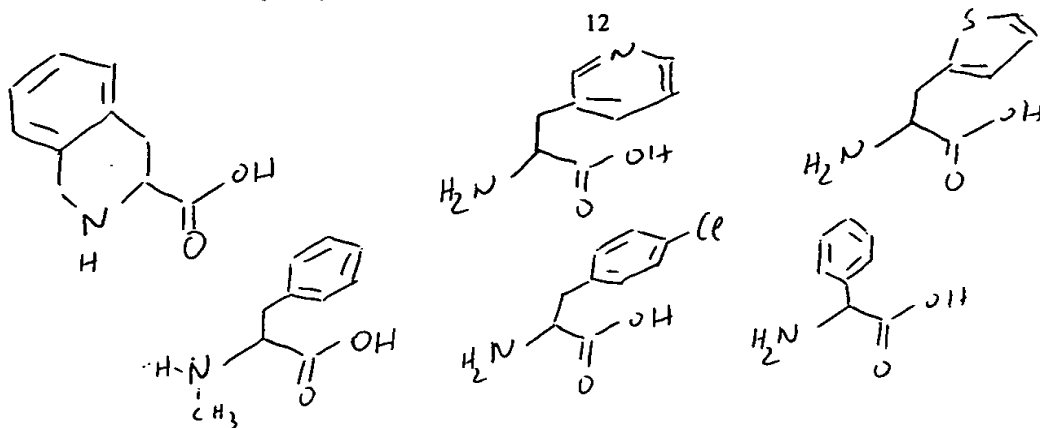
notamment les dérivés de statine de formule :



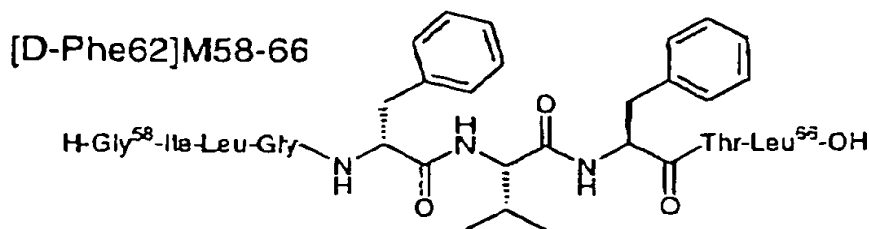
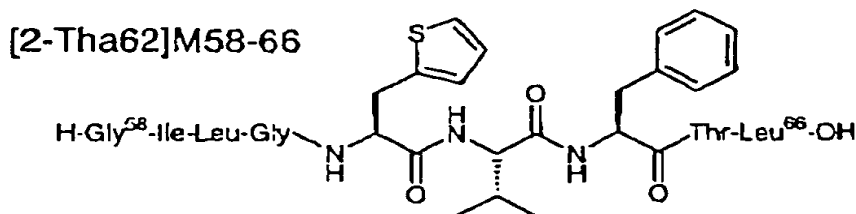
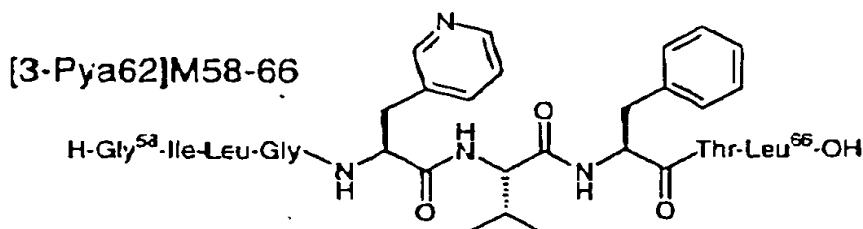
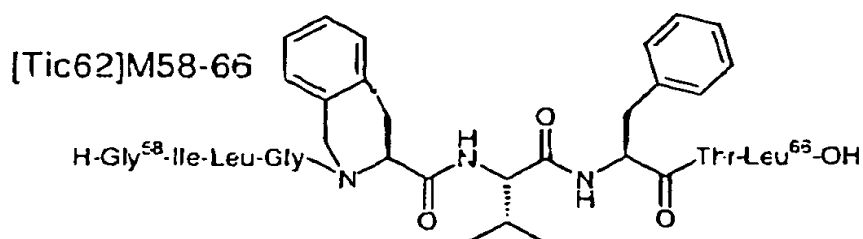
dans laquelle R_1 , et R_2 sont tels que définis ci-dessus.

Avantageusement, les acides aminés non protéinogéniques utilisés dans le
 cadre de la présente invention sont choisis parmi ;

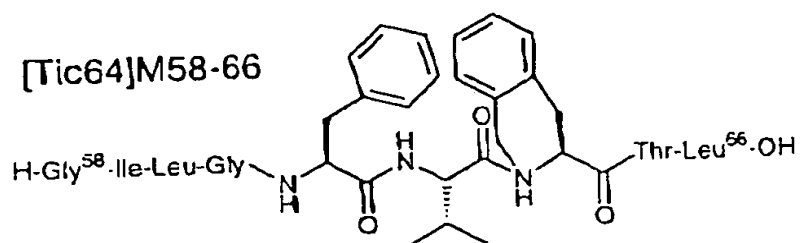




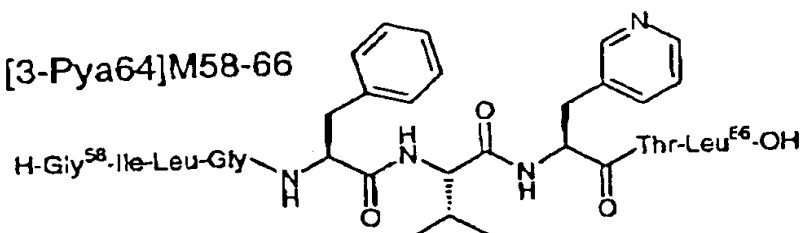
L'invention a plus particulièrement pour objet les analogues peptidiques du peptide parent M58-66 du virus de la grippe et comportant des acides aminés non protéinogéniques, répondant aux formule suivantes :



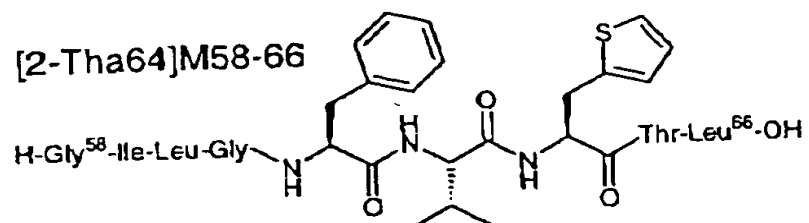
[Tic64]M58-66



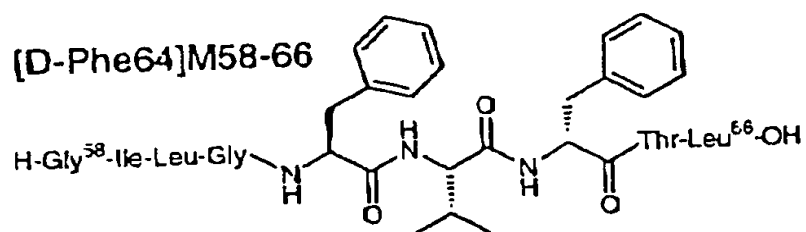
[3-Pya64]M58-66



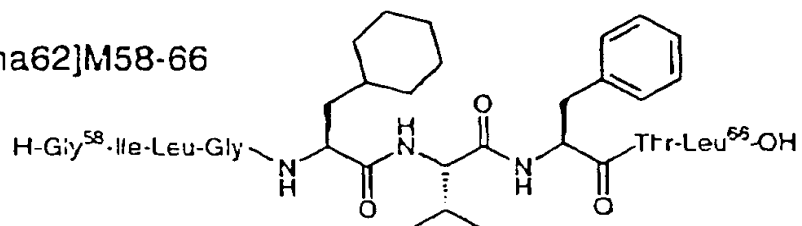
[2-Tha64]M58-66



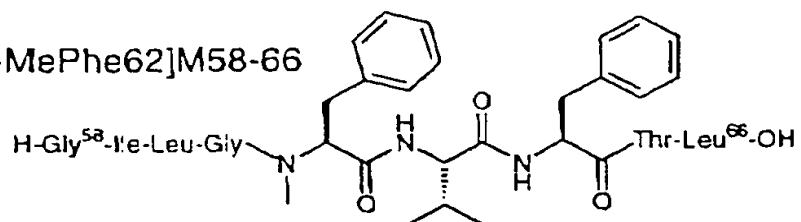
[D-Phe64]M58-66

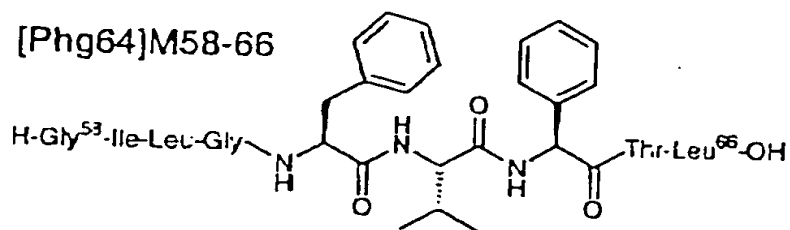
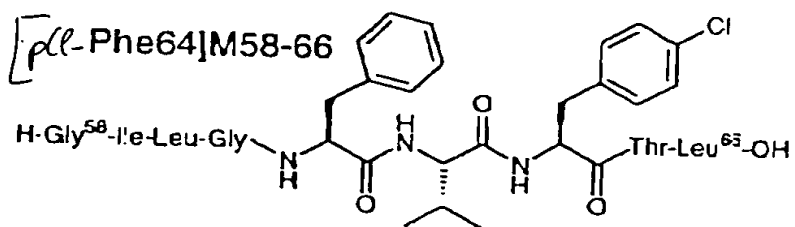
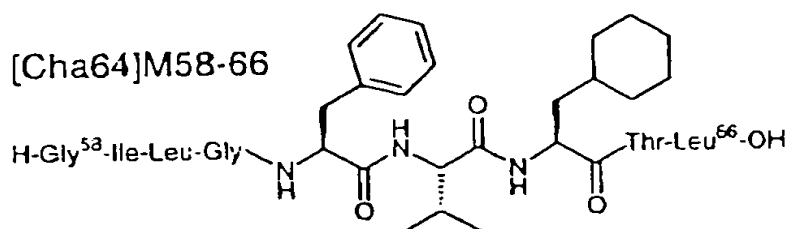
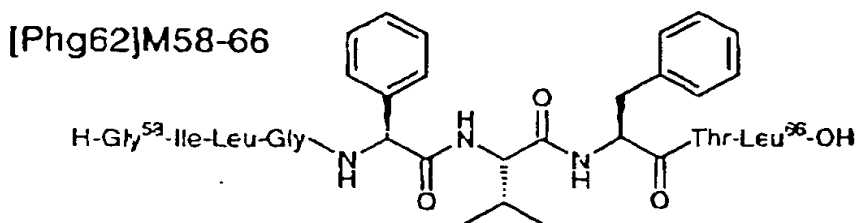
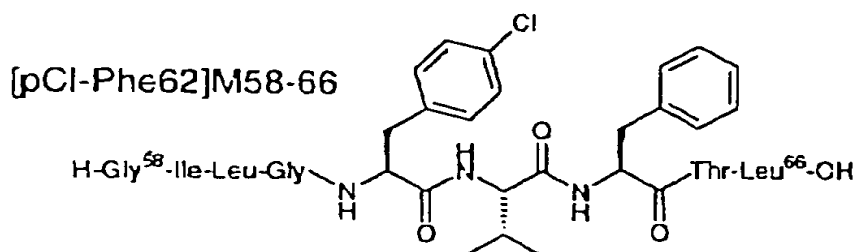


[Cha62]M58-66



[N-MePhe62]M58-66





Avantageusement, les analogues peptidiques susmentionnés de l'invention sont sélectionnés parmi ceux susceptibles :

- d'une part d'être reconnus par les molécules du CMH et de s'associer avec ces dernières, notamment par mise en oeuvre de la méthode suivante :

5 • incubation (notamment pendant environ 2 heures à 25°C, puis environ 12 heures à 4°C) de l'analogue peptidique en présence de molécules du CMH, provenant de la lyse de cellules humaines ou animales, ou purifiées notamment par chromatographie d'affinité à partir de lignées cellulaires humaines ou animales, sur un support solide recouvert d'un premier anticorps, notamment
10 monoclonal, reconnaissant spécifiquement les molécules du CMH dans leur conformation dépendante de leur liaison audit analogue peptidique,

 • addition sur le support solide précédent d'un deuxième anticorps marqué, notamment par couplage à un marqueur radioactif, enzymatique ou
15 fluorescent, ledit anticorps marqué reconnaissant spécifiquement soit les molécules du CMH dans leur conformation dépendante de leur liaison à l'analogue peptidique, soit une molécule se liant elle-même spécifiquement aux molécules du CMH dans leur conformation susmentionnée, notamment la β 2-microglobuline reconnaissant spécifiquement les molécules du CMH de classe I,

 • détection, après rinçage du support solide, de l'éventuelle présence du
20 deuxième anticorps marqué resté fixé sur le support solide, témoignant d'un effet de reconnaissance et d'association entre les molécules du CMH et l'analogue peptidique étudié,

- et, d'autre part, de former un complexe avec lesdites molécules du CMH, dont la stabilité peut être évaluée par mise en oeuvre d'une méthode de
25 suivi dans le temps de la liaison établie entre l'analogue peptidique et les molécules du CMH, cette méthode étant avantageusement effectuée selon un protocole identique à la méthode précédente, mais dans laquelle l'étape d'incubation de l'analogue peptidique en présence des molécules du CMH sur le support solide recouvert dudit premier anticorps, se fait (avantageusement à une
30 température de 37°C) pendant des temps variables de quelques minutes à plusieurs jours.

Les analogues peptidiques de l'invention doivent être reconnus par les molécules de CMH et s'associer à ces dernières, notamment dans le cadre de la mise en oeuvre du test de reconnaissance décrit ci-dessus. Cette association peut
35 être faible (détectable à des concentrations en analogues peptidiques de l'ordre de 10^{-4} à 10^{-5} M), intermédiaire (détectable à des concentrations en analogues peptidiques de l'ordre de 10^{-5} à 10^{-7} M), ou forte (détectable à des concentrations en analogues peptidiques de l'ordre de 10^{-8} à 10^{-9} M).

Les analogues peptidiques reconnus par les molécules du CMH dans le cadre de la présente invention sont de préférence susceptibles de se lier pendant au moins environ 30 minutes auxdites molécules du CMH.

L'invention a plus particulièrement pour objet les analogues peptidiques tels que décrits ci-dessus et caractérisés en ce qu'ils sont sélectionnés parmi ceux susceptibles :

- d'induire *in vitro* l'apparition et la croissance de lymphocytes T cytotoxiques à partir de cellules humaines ou animales, notamment à partir de cellules mononucléées issues du sang périphérique (PBMC), en présence de facteurs nécessaires à la croissance et la différenciation des cellules T cytotoxiques,

- d'induire *in vitro* la cytolyse par des lymphocytes T cytotoxiques, de cellules cibles présentant à leur surface l'analogue peptidique associé aux molécules du CMH, lesdits lymphocytes T cytotoxiques étant avantageusement prélevés sur un patient atteint d'une pathologie dans laquelle est impliqué le peptide parent de l'analogue peptidique étudié,

- et d'induire *in vitro* la sécrétion de cytokines (ou interleukines) par les lymphocytes T cytotoxiques susmentionnés, notamment IL-2, IL-4 ou l'interféron γ ,

lesdits analogues peptidiques ainsi sélectionnés étant :

- . soit des agonistes des récepteurs (TCR) reconnaissant l'antigène (à savoir le peptide parent) des cellules T cytotoxiques, et dérivent de peptides parents se comportant eux-mêmes comme des agonistes ou des antagonistes desdits récepteurs,

- . soit des agonistes partiels desdits récepteurs, et dérivent de peptides parents se comportant eux-mêmes comme des agonistes desdits récepteurs, ces agonistes partiels induisant notamment la sécrétion d'une ou plusieurs cytokines différentes de celles dont la sécrétion est induite par les peptides parents.

L'invention a plus particulièrement pour objet les analogues peptidiques tels que décrits ci-dessus et caractérisés en ce qu'ils sont sélectionnés parmi ceux :

- susceptibles d'induire *in vitro* l'apparition et la croissance de lymphocytes T cytotoxiques à partir de cellules humaines ou animales, notamment à partir de cellules mononucléées issues du sang périphérique (PBMC), en présence de facteurs nécessaires à la croissance et la différenciation des cellules T cytotoxiques,

- n'induisant pas *in vitro* la cytolyse par des lymphocytes T cytotoxiques, de cellules cibles présentant à leur surface l'analogue peptidique associé aux molécules du CMH, lesdits lymphocytes T cytotoxiques étant avantageusement

prélevés sur un patient atteint d'une pathologie dans laquelle est impliqué le peptide parent de l'analogue peptidique étudié,

- n'induisant pas *in vitro* la sécrétion de cytokines (ou interleukines) par les lymphocytes T cytotoxiques susmentionnés, notamment IL-2, IL-4 ou l'interféron γ ,

lesdits analogues peptidiques ainsi sélectionnés étant des antagonistes des récepteurs des cellules T cytotoxiques.

L'invention a également pour objet l'utilisation d'analogues peptidiques tels que définis ci-dessus pour la préparation de médicaments, notamment de vaccins, destinés à la prévention ou au traitement des pathologies dans lesquelles les peptides parents sont des agonistes ou antagonistes des récepteurs reconnaissant l'antigène des cellules T cytotoxiques, et plus particulièrement des pathologies neurodégénératives infectieuses (d'origine virale ou bactérienne), tumorales (notamment le mélanome), auto-immunes et allergiques.

Parmi les maladies d'origine virale susceptibles d'être traitées dans le cadre de la présente invention, on peut citer:

- le SIDA provoqué par le virus de l'immuno-déficience humaine HIV1 et HIV2,

- la paraplégie associée à HTVL-1, ou la leucémie à cellules T de l'adulte, provoquée par le virus de la leucémie humaine à cellules T (virus HTLV),

- infections provoquées par le virus respiratoire syncytial,

- infections provoquées par le virus coxsakie, par exemple méningites aiguës lymphocytaires,

- infections provoquées par le virus d'Epstein-Barr, par exemple la mononucléose infectieuse,

- infections provoquées par le cytomégalovirus, par exemple maladie des inclusions cytomégaliqes,

- herpès provoqué par le virus de l'herpès humain,

- herpès provoqué par le virus 6 de l'herpès simplex,

- infections provoquées par le parvovirus B19 humain, par exemple gastro-entérites infectieuses,

- l'hépatite B provoquée par le virus de l'hépatite B,

- l'hépatite C provoquée par le virus de l'hépatite C,

- la grippe provoquée par le virus influenza,

- la rubéole provoquée par le virus de la rubéole,

- infections provoquées par le virus de la Dengue, par exemple arboviroses,

- rhumes, rhinites, coryza provoqués par les rhinovirus

- la fièvre aphteuse provoquée par le virus de la fièvre aphteuse,

- le cancer du col de l'utérus provoqué par le papillomavirus (HPV).

Parmi les principales maladies auto-immunes susceptibles d'être traitées dans le cadre de la présente invention, on peut citer celles rassemblées dans le Tableau A qui suit.

Tableau A

5 Principales maladies auto-immunes (en allant de haut en bas, des maladies auto-immunes spécifiques d'organes aux maladies auto-immunes non spécifiques d'organes).

	Maladies	Autoantigènes impliqués
10	Thyroïdite de Hashimoto	Thyroglobuline, microsomes
	Maladie de Basedow	Récepteur TSH
	Maladie d'Addison	Corticosurrénale
	Insuffisance hypophysaire	Hypophyse
15	Gastrite de Biermer	Cellule pariétale de l'estomac
		Facteur intrinsèque
	Certaines stérilités	Spermatozoïdes, ovaires
	Diabète juvénile de type 1	Ilots Langerhans, insuline
20	Syndrome de Goodpasture	Membrane basale glomérulaire
	Myasthénie	Muscle strié, récepteur acétyl-choline
	Rhumatisme articulaire aigu	Myocarde (streptocoques)
25	Pemphigus	Ponts intercellaires épiderme
	Pemphigoïde bulleuse	Membrane basale cutanée
	Dermatite herpétiforme	Gliadine, réticuline
	Vitiligo	Mélanocytes
	Pelade	Follicule pileux
30	Psoriasis	
	Ophtalmie sympathique	Uvée
	Uvéite	Chambre antérieure de l'oeil
	Syndrome de Guillain-Baré	
	Sclérose en plaques	Myéline
35	Anémie hémolytique	Hématies
	Purpura thrombopénique idiopathique	Plaquettes
	Leucopénie idiopathique	Granulocytes
	Cirrhose biliaire primitive	Mitochondries

	Hépatite chronique active	Muscle lisse, noyaux
	Rectocolite hémorragique	
	Iléite de Crohn	Côlon (<i>E. coli</i>)
	Syndrome de Gougerot-Sjögren	Noyaux: SS-A, SS-B
5	Polyarthrite rhumatoïde	IgG, noyaux
	Dermatopolymyosite	Noyaux: Jo1, muscles
	Sclérodermie	Noyaux: Scl-70
	Connectivite mixte	Noyaux: RNP
	Lupus érythémateux discoïde	Noyaux:
10	Lupus érythémateux disséminé	Noyaux: ADN, antigène Sm
		Facteurs de coagulation
		Cardiolipine, etc...

15 L'invention a également pour objet toute composition pharmaceutique, caractérisée en ce qu'elle comprend à titre de principe actif, au moins un analogue peptidique (agoniste, le cas échéant partiel, ou antagoniste) tel que défini ci-dessus, en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

20 Avantageusement, les compositions pharmaceutiques selon l'invention se présentent sous une forme administrable par voie orale, ou parentérale, notamment à raison d'environ 500 μ g à 5 mg par prise, notamment à raison de 3 prises par jour.

25 L'invention a plus particulièrement pour objet les compositions pharmaceutiques telles que décrites ci-dessus, contenant à titre de principe actif au moins un antagoniste selon l'invention, et leur utilisation dans le cadre du traitement des maladies auto-immunes.

30 L'invention a plus particulièrement pour objet encore, les compositions pharmaceutiques telles que décrites ci-dessus, contenant à titre de principe actif au moins un agoniste partiel selon l'invention, et leur utilisation dans le cadre du traitement des maladies allergiques.

L'invention a également pour objet tout vaccin, caractérisé en ce qu'il comprend à titre de principe actif, au moins un analogue peptidique, de préférence agoniste, le cas échéant partiel, tel que défini ci-dessus, en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

35 Avantageusement, les vaccins selon l'invention se présentent sous une forme administrable par voie orale, ou parentérale, notamment à raison d'environ 500 μ g à 5 mg par prise, notamment à raison de 3 prises par jour.

L'invention a également pour objet toute composition destinée au diagnostic *in vivo* des pathologies susmentionnées, ou à l'évaluation *in vivo* de la réponse

immunitaire dans le cadre des pathologies susmentionnées, par mise en oeuvre d'une réaction cutanée d'hypersensibilité par injection intradermique de ladite composition de diagnostic, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un analogue peptidique, de préférence agoniste, le cas échéant partiel, tel que défini ci-dessus, en association avec un véhicule biologiquement acceptable.

L'invention concerne également les complexes entre un analogue peptidique tel que défini ci-dessus, et une molécule du complexe majeur d'histocompatibilité (encore désigné complexes binaires CMH-analogue peptidique).

En effet, la réponse immunitaire met en jeu la reconnaissance d'un antigène endogène ou exogène par des cellules spécialisées. Pour être reconnu, l'antigène doit être initialement présenté de façon adéquate par des cellules présentatrices d'antigène (CPA). Alors que les lymphocytes B reconnaissent des épitopes portés par les antigènes intacts non modifiés, la présentation de l'antigène aux lymphocytes T est plus complexe dans la mesure où l'antigène est d'abord internalisé par la cellule présentatrice, protéolysé, puis éventuellement réexprimé à sa surface sous forme de fragments peptidiques en association avec les protéines du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). Le lymphocyte T qui ne reconnaît pas l'antigène natif, reconnaît un fragment peptidique associé à une molécule CMH.

Ces molécules CMH appartiennent essentiellement à deux classes: I et II.

Les molécules de classe I sont des glycoprotéines transmembranaires constituées d'une chaîne lourde α polymorphe associée de façon non covalente à une chaîne légère non glycosylée β_2m . Leur structure cristallographique a été résolue (Bjorkman et al. (1987), Nature, 329: 506-512), et montre la présence d'un sillon formant le site de présentation du peptide dont le fond est composé de huit feuillets β et les bords de deux hélices α . Ces molécules sont présentées à la surface de la quasi totalité des cellules.

Les molécules de classe II sont également des glycoprotéines membranaires constituées de deux chaînes polymorphes α et β liées de façon non covalentes pour former, comme le montre la structure cristallographique récemment élucidée (Brown et al. (1993), Nature, 364: 33-39), une plateforme β plissée supportant deux hélices α . Le sillon formé est le site de présentation du peptide. Ces molécules ne sont exprimées qu'à la surface de certaines cellules parmi lesquelles les macrophages et les cellules B.

Les lymphocytes T cytotoxiques (cellules possédant des marqueurs CD8) reconnaissent des fragments protéolytiques de protéines virales associées aux molécules CMH de classe I et provoquent la lyse des cellules présentant l'antigène.

Les lymphocytes T auxiliaires (cellules portant des marqueurs CD4) reconnaissent des fragments de protéines exogènes capturées par endocytose présentés en association avec les molécules CMH de classe II et induisent la stimulation cellulaire de la réponse immunitaire.

5 L'invention a également pour objet les complexes entre un analogue peptidique selon l'invention, et un récepteur de cellules T (encore désignés complexes récepteur T-analogue peptidique).

L'invention vise également les complexes entre une molécule du complexe majeur d'histocompatibilité, un analogue peptidique tel que défini ci-dessus, et un
10 récepteur de cellules T (encore désigné complexe ternaire CMH-analogue peptidique-récepteur T).

L'invention a également pour objet l'utilisation d'analogues peptidiques tels que définis ci-dessus, pour la mise en oeuvre d'une méthode de diagnostic *in vitro* des pathologies mentionnées ci-dessus.

15 L'invention a plus particulièrement pour objet, toute méthode de diagnostic *in vitro* de pathologies associées à la présence dans l'organisme d'un patient, de peptides exogènes ou endogènes pouvant interagir avec des molécules du CMH, et susceptibles d'être directement ou indirectement impliqués dans le processus de développement de ces pathologies chez l'homme ou l'animal, caractérisée en ce
20 qu'elle comprend:

- la mise en contact d'un échantillon biologique provenant d'un patient, notamment du sang ou tout échantillon biologique susceptible de contenir des lymphocytes, avec un analogue peptidique tel que défini ci-dessus, dans des conditions permettant la réaction entre les récepteurs des cellules T susceptibles
25 d'être présentes dans l'échantillon biologique, et le susdit complexe binaire formé entre ledit analogue peptidique et les molécules de CMH présentes dans ledit échantillon;

- la détection *in vitro* du complexe ternaire CMH-analogue peptidique-récepteur T, susceptible d'être formé à l'étape précédente.

30 Les méthodes de diagnostic susmentionnées de l'invention sont avantageusement réalisées de la façon suivante:

- incubation dudit échantillon biologique avec des analogues peptidiques selon l'invention, lesdits analogues peptidiques étant fixés sur un support solide, notamment à l'intérieur de puits de plaques de microtitration de type de celles
35 habituellement utilisées pour la mise en oeuvre de techniques de détection ou dosage bien connues sous le nom d'ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay),

- rinçage du support solide,

- incubation des éléments restés fixés sur le support solide après l'étape de rinçage précédente avec un milieu contenant des anticorps, notamment des anticorps anti-complexe ternaire selon l'invention, marqués (notamment de manière radioactive, enzymatique ou fluorescente), ou susceptibles d'être reconnus à leur tour par un réactif marqué,

- rinçage du support solide,
- détection des anticorps marqués restés respectivement liés aux complexes ternaires lors de l'étape d'incubation précédente.

L'invention a également pour objet les nécessaires ou kits pour la mise en oeuvre de méthodes de diagnostic *in vitro* telles que décrites ci-dessus, comprenant:

- un analogue peptidique tel défini ci-dessus ;
- des réactifs pour rendre un milieu apte à la formation d'une réaction immunologique ;
- des réactifs permettant de détecter le complexe ternaire selon l'invention, qui a été produit à l'issue de la réaction immunologique, lesdits réactifs contenant éventuellement un marqueur ou étant susceptibles d'être reconnus à leur tour par un réactif marqué, plus particulièrement dans le cas où l'analogue peptidique n'est pas marqué.

L'invention a également pour objet les anticorps dirigés contre les complexes binaires CMH-analogue peptidique tels que définis ci-dessus, lesdits anticorps étant tels qu'obtenus par immunisation d'un animal avec au moins un des complexes susmentionnés, lesdits anticorps étant susceptibles de former un complexe avec ces complexes binaires.

Les anticorps selon l'invention sont des anticorps polyclonaux ou monoclonaux.

Les anticorps polyclonaux susmentionnés sont obtenus par immunisation d'un animal avec au moins un complexe CMH-analogue peptidique selon l'invention, suivie de la récupération des anticorps recherchés sous forme purifiée, par prélèvement du sérum dudit animal, et séparation desdits anticorps des autres constituants du sérum, notamment par chromatographie d'affinité sur une colonne sur laquelle est fixée un antigène spécifiquement reconnu par les anticorps, notamment un complexe CMH-analogue peptidique selon l'invention.

Les anticorps monoclonaux selon l'invention peuvent être obtenus par la technique des hybridomes dont le principe général est rappelé ci-après.

Dans un premier temps, on immunise un animal, généralement une souris, (ou des cellules en culture dans le cadre d'immunisations *in vitro*) avec un complexe CMH-analogue peptidique selon l'invention, dont les lymphocytes B sont alors capables de produire des anticorps contre ledit complexe. Ces

lymphocytes producteurs d'anticorps sont ensuite fusionnés avec des cellules myélomateuses "immortelles" (notamment murines) pour donner lieu à des hybridomes. A partir du mélange hétérogène des cellules ainsi obtenu, on effectue alors une sélection des cellules capables de produire un anticorps particulier et de se multiplier indéfiniment. Chaque hybridome est multiplié sous la forme de clone, chacun conduisant à la production d'un anticorps monoclonal dont les propriétés de reconnaissance vis-à-vis du complexe CMH-analogue peptidique de l'invention pourront être testées par exemple en ELISA, par immunotransfert en une ou deux dimensions, en immunofluorescence, ou à l'aide d'un biocapteur. Les anticorps monoclonaux ainsi sélectionnés, sont par la suite purifiés notamment selon la technique de chromatographie d'affinité décrite ci-dessus.

Les anticorps selon l'invention, sont plus particulièrement caractérisés en ce qu'ils sont susceptibles de former un complexe avec des complexes CMH-analogues peptidiques, et/ou avec les complexes CMH-peptides ou protéines parents correspondant auxdits analogues peptidiques.

Avantageusement, les anticorps anti-complexes CMH-analogues peptidiques de l'invention reconnaissent les complexes CMH-peptides ou protéines parents susmentionnés avec une affinité au moins égale à celle présentée par les anticorps anti-complexes CMH-peptides ou protéines parents vis à vis des complexes CMH-peptides ou protéines parents .

L'affinité dont il 'est question ci-dessus peut se mesurer par la constante d'affinité à l'équilibre K_a des complexes impliquant l'un des susdits anticorps avec l'un des susdits complexes.

L'invention a également pour objet toute composition pharmaceutique, caractérisée en ce qu'elle comprend des anticorps tels que définis ci-dessus, en association avec un véhicule physiologiquement acceptable, ainsi que leur utilisation dans le cadre du traitement des pathologies susmentionnées.

L'invention concerne également le procédé de criblage d'analogues peptidiques tels que définis ci-dessus, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- incubation (notamment à une température de 37°C) pendant des temps variables de quelques minutes à plusieurs jours, de l'analogue peptidique en présence de molécules du CMH, provenant de la lyse de cellules humaines ou animales, ou purifiées notamment par chromatographie d'affinité à partir de lignées cellulaires humaines ou animales, sur un support solide recouvert d'un premier anticorps, notamment monoclonal, reconnaissant spécifiquement les molécules du CMH dans leur conformation dépendante de leur liaison audit analogue peptidique,

• addition sur le support solide précédent d'un deuxième anticorps marqué, notamment par couplage à un marqueur radioactif, enzymatique ou fluorescent, ledit anticorps marqué reconnaissant spécifiquement soit les molécules du CMH dans leur conformation dépendante de leur liaison à l'analogue peptidique, soit une molécule se liant elle-même spécifiquement aux molécules du CMH dans leur conformation susmentionnée, notamment la β 2-microglobuline reconnaissant spécifiquement les molécules du CMH de classe I,

• détection, après rinçage du support solide, de l'éventuelle présence du deuxième anticorps marqué resté fixé sur le support solide,

• évaluation de la durée de l'association entre ledit analogue peptidique et les molécules du CMH.

L'invention a également pour objet toute trousse ou kit pour la mise en oeuvre d'un procédé de criblage d'analogues peptidiques tel que défini ci-dessus, comprenant :

- des molécules du CMH, et/ou
- des anticorps, reconnaissant spécifiquement les molécules du CMH dans leur conformation dépendante de leur liaison audit analogue peptidique, avantageusement fixés sur un support solide, ou fournis avec les réactifs nécessaires à leur fixation sur le support solide, et/ou

- des anticorps marqués, notamment par couplage à un marqueur radioactif, enzymatique ou fluorescent, reconnaissant spécifiquement soit les molécules du CMH dans leur conformation dépendante de leur liaison à l'analogue peptidique, soit une molécule se liant elle-même spécifiquement aux molécules du CMH dans leur conformation susmentionnée, notamment la β 2-microglobuline reconnaissant spécifiquement les molécules du CMH de classe I, et/ou

- un protocole pour la mise en oeuvre dudit procédé, et/ou
- un peptide de contrôle.

L'invention sera davantage illustrée à l'aide des exemples qui suivent d'obtention et d'étude des propriétés d'analogues peptidiques tels que décrits ci-dessus.

I- Synthèse des analogues peptidiques de l'invention :

A) Généralités :

A titre d'illustration, la méthode de synthèse en phase liquide consiste à condenser successivement deux à deux les aminoacyles dans l'ordre requis ou à condenser des aminoacyles et des fragments préalablement formés et contenant déjà plusieurs aminoacyles dans l'ordre approprié, ou encore plusieurs fragments préalablement ainsi préparés, étant entendu que l'on aura eu soin de protéger au préalable toutes les fonctions réactives portées par ces aminoacyles ou fragments,

à l'exception des fonctions amines de l'un et carboxyles de l'autre ou vice-versa, qui doivent normalement intervenir dans la formation des liaisons peptidiques, notamment après activation de la fonction carboxyle, selon les méthodes bien connues dans la synthèse des peptides.

5 On pourra par exemple utiliser des groupements protecteurs de type uréthane (Boc, Fmoc benzyloxycarbonyl ou allyloxycarbonyl) pour protéger les extrémités N-terminales des acides aminés et des groupements de type ester (méthylique, éthylique, benzylique, tertio-butylique, allylique ou encore benzhydryl glycolamidique) pour protéger les extrémités C-terminales des acides
10 aminés.

Une telle synthèse peut être effectuée en condensant tout d'abord le résidu aminoacyle AA1 dont la fonction COOH est protégée avec le résidu aminoacyle AA2 dont la fonction NH₂ est protégée. La fonction amine du résidu AA2 dans le fragment AA2-AA1 ainsi obtenu, est alors déprotégée, pour condenser par la suite
15 ledit fragment avec le résidu aminoacyle AA3 dont la fonction amine est protégée. Les étapes précédentes sont répétées autant de fois qu'il y a de résidus aminoacyles à introduire dans la chaîne des rétro analogues à synthétiser.

Selon une autre technique préférée de l'invention, on a recours à celle décrite par R.D. Merrifield dans l'article intitulé "Solid phase peptide synthesis" (J. Am. Chem. Soc. (1963), 85, 2149-2154).
20

Pour fabriquer une chaîne peptidique selon le procédé de Merrifield, on a recours à une résine polymère très poreuse, sur laquelle on fixe le premier acide aminé C-terminal (en l'occurrence AA1-OH) de la chaîne. Cet acide aminé est fixé sur la résine par l'intermédiaire de son groupe carboxylique et sa fonction amine
25 est protégée, par exemple par le groupe t-butyloxycarbonyle.

Lorsque le premier acide aminé C-terminal est ainsi fixé sur la résine, on enlève le groupe protecteur de la fonction amine en lavant la résine avec un acide.

On fixe ainsi, les uns après les autres, les acides aminés qui vont constituer la chaîne peptidique sur le groupe amine chaque fois déprotégé au préalable de la
30 portion de la chaîne peptidique déjà formée, et qui est rattachée à la résine.

Lorsque la totalité de la chaîne peptidique désirée est formée, on élimine les groupes-protecteurs des différents acides aminés constituant la chaîne peptidique et on détache le peptide de la résine par exemple à l'aide d'acide fluorhydrique.

35 **B) Cas particulier des analogues peptidiques de l'invention :**

Une ou plusieurs des étapes de synthèse décrites ci-dessus peuvent être interrompues afin d'insérer une liaison différente de la liaison -CO-NH- entre certains résidus aminoacyles, et/ou un ou plusieurs acides aminés non protéinogéniques.

B.1.) Synthèse d'analogues peptidiques comportant des liaisons peptidiques modifiées :

La notation Ψ (Spatola & Darlak, 1988) est généralement d'usage pour désigner le lien pseudopeptidique remplaçant la liaison amide (CONH). Parmi les modifications les plus fréquemment rencontrées, on peut citer par exemple les suivantes dont les synthèses sont détaillées dans les références bibliographiques indiquées : la liaison méthylèneamino (réduite) $\Psi[\text{CH}_2\text{NH}]$ (Szelke *et al.*, 1982 ; Martinez *et al.*, 1985 ; Sasaki & Coy, 1987) ; rétro-inverso $\Psi[\text{NHCO}]$ (Shemyakin *et al.*, 1969 ; Goodman & Chorev, 1979 ; Chorev & Goodman, 1993) ; oléfine $\Psi[\text{CH}=\text{CH}]$ (Hann *et al.*, 1982 ; Kempf *et al.*, 1991 ; Bohnstedt *et al.*, 1993) ; carba $\Psi[\text{CH}_2\text{CH}_2]$ (Rodriguez *et al.*, 1990a, 1990b) ; méthylèneoxy (éther) $\Psi[\text{CH}_2\text{O}]$ (TenBrink, 1986 ; Breton *et al.*, 1990) ; cétométhylène $\Psi[\text{COCH}_2]$ (Harbeson & Rich, 1989 ; Gonzalez-Muniz *et al.*, 1995), hydroxy éthylène $\Psi[\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2]$ (Evans *et al.*, 1985 ; Wuts *et al.*, 1992).

1) Synthèse des pseudopeptides réduits correspondant aux séquences de MART et du peptide matrice M58-66 :

La contribution de la fonction amine de chaque liaison peptidique de l'antigène Mart-1 27-35 (AAGIGILTV) de la protéine Mart-1 du mélanome et de l'antigène M58-66 (GLLG FVFTL) de la protéine matrice du virus de la grippe a été évaluée au niveau des interactions de ces antigènes avec leurs récepteurs: la molécule de classe I du MHC HLA-A2 et le TCR.

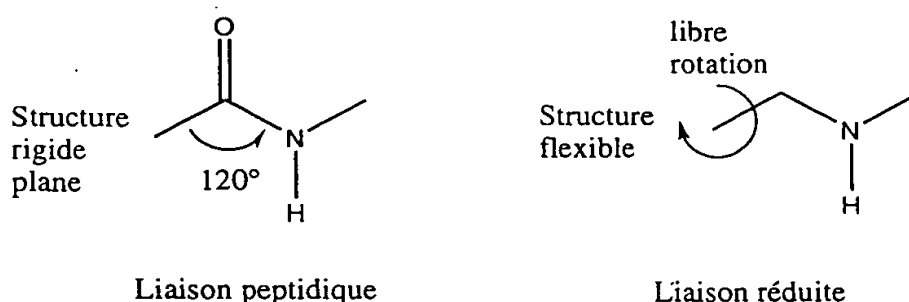


Schéma 1: Représentation schématique des liaisons peptidique et réduite.

La liaison réduite ou méthylène amino a la particularité d'être plus flexible que la liaison peptidique en raison d'une libre rotation de la liaison carbone-carbone (schéma 1). L'introduction d'une liaison réduite peut modifier localement l'orientation des chaînes latérales des acides aminés. La liaison réduite peut exister sous sa forme protonée à pH physiologique. Les modifications entraînées par la

présence d'une liaison réduite, à savoir la modification de la structure et la modification du caractère hydrophile du peptide parent, peuvent avoir des implications dans les phénomènes de fixation et de reconnaissance de l'antigène.

La synthèse de chaque peptide réduit a été réalisée en phase solide et en chimie Fmoc classique. La liaison réduite est obtenue par condensation d'un α -amino aldéhyde N-protégé avec l'acide α -aminé immobilisé sur la résine. L'imine formée est réduite *in situ* par le cyanoborohydrure de sodium pour conduire à la liaison réduite selon la méthode décrite par Sasaki et Coy en 1987 (schéma 2).

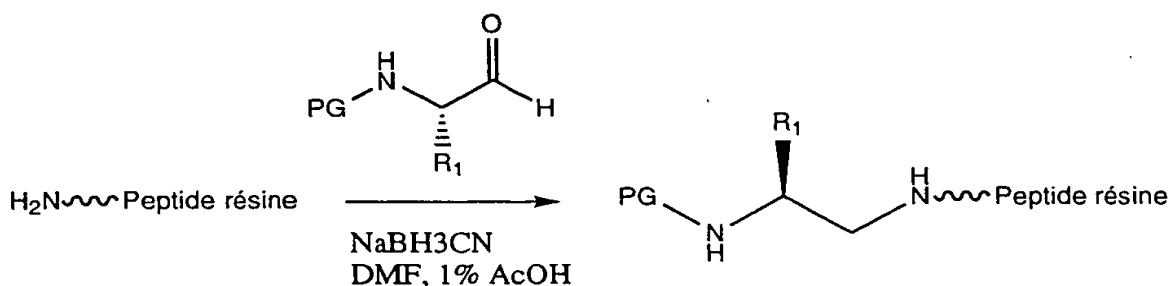
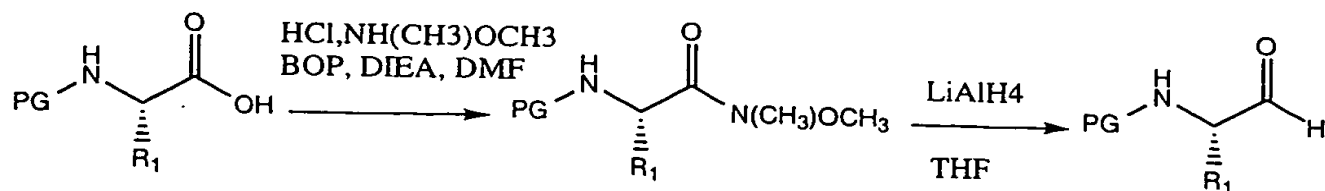


Schéma 2: Incorporation en phase solide de la liaison réduite. PG: groupement protecteur Fmoc.

L' α -amino aldéhyde est synthétisé par la méthode de Fehrentz et Castro, 1983. Cette méthode permet l'obtention rapide, sans racémisation, de l' α -amino aldéhyde N-protégé à partir du N,O-diméthylhydroxamate de l'acide aminé N-protégé correspondant (schéma 3).



10

Schéma 3: Synthèse des α -amino aldéhydes N-protégés par la méthode de
15 Fehrentz et Castro. PG: groupement protecteur Fmoc.

Les acides aminés suivants de la séquence du peptide réduit sont couplés
d'une manière classique. Après synthèse, le peptide réduit est déprotégé et
décroché de la résine par l'acide trifluoroacétique (TFA). Chaque peptide réduit
est purifié par chromatographie liquide haute pression à polarité de phases inversée
20 (RP-HPLC). La masse de chaque peptide est contrôlée par désorption laser
assistée d'une matrice (MALDI) à l'aide du spectromètre Bruker Protein TOF.

Les temps de rétention (Tr) sur colonne RP-HPLC C18 dans un gradient de
5 à 65 % de B en 30 mn (avec A = eau à 0,1% de TFA et B = acétonitrile (ACN)
à 0,08% de TFA) ainsi que les masses des différents peptides sont reportés dans
25 les tables 1 et 2.

Table 1: Séquences et caractéristiques des peptides réduits analogues de
Mart-1 27-35

30	Séquences									Tr	masse	
	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9			
	MART1 27-35	H- A	- A	- G	- I	- G	- I	- L	- T	- V -OH	12.74	814.4
	Ψ(1-2)	H-AΨ(CH ₂ NH)A	-G	- I	- G	- I	- L	- T	- V	-OH	12.53	802.7
35	Ψ(2-3)	H- A- AΨ(CH ₂ NH)G	- I	- G	- I	- L	- T	- V	-OH	12.58	802.9	
	Ψ(3-4)	H- A	- A -GΨ(CH ₂ NH)I	- G	- I	- L	- T	- V	-OH	11.85	801.6	
	Ψ(4-5)	H- A	- A - G	- IΨ(CH ₂ NH)G	- I	- L	- T	- V	-OH	12.03	801.5	
	Ψ(5-6)	H- A	- A - G	- I - GΨ(CH ₂ NH)I	- L	- T	- V	-OH	11.29	801.4		
	Ψ(6-7)	H- A	- A - G	- I - G	- IΨ(CH ₂ NH)L	- T	- V	-OH	12.00	800.4		
40	Ψ(7-8)	H- A	- A - G	- I - G	- I - LΨ(CH ₂ NH)T	- V	-OH	12.77	801.5			
	Ψ(8-9)	H- A	- A - G	- I - G	- I - L	- TΨ(CH ₂ NH)V	-OH	12.46	801.3			

Table 2: Séquences et caractéristiques des peptides réduits analogues de M58-66

5	Séquences											
	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	Tr	masse	
M58-66	H	G	-L	-L	G	-F	-V	-F	-T	-L	-OH	12.35* 968.0
10 Ψ(1-2)	H-G	Ψ(CH ₂ NH)L	-L	-G	-F	-V	-F	-T	-L	-OH	10.67* 956.2	
Ψ(2-3)	H-G	-L	Ψ(CH ₂ NH)L	-G	-F	-V	-F	-T	-L	-OH	11.18* 957.1	
Ψ(3-4)	H-G	-L	-L	Ψ(CH ₂ NH)G	-F	-V	-F	-T	-L	-OH	16.01 957.3	
Ψ(4-5)	H-G	-L	-L	-G	Ψ(CH ₂ NH)F	-V	-F	-T	-L	-OH	15.61 954.3	
Ψ(5-6)	H-G	-L	-L	-G	-F	Ψ(CH ₂ NH)V	-F	-T	-L	-OH	10.80* 955.8	
15 Ψ(6-7)	H-G	-L	-L	-G	-F	-V	Ψ(CH ₂ NH)F	-T	-L	-OH	11.85* 953.2	
Ψ(7-8)	H-G	-L	-L	-G	-F	-V	-F	Ψ(CH ₂ NH)T	-L	-OH	13.05* 954.7	
Ψ(8-9)	H-G	-L	-L	-G	-F	-V	-F	-T	Ψ(CH ₂ NH)L	-OH	11.21* 957.3	

Temps de rétention dans le gradient 20 à 80% de B en 30 mn (avec A = eau à 0,1% de TFA et B = ACN à 0,08% de TFA).

2) Synthèse des analogues β du peptide MART parent et du peptide MART muté (Leu²⁸) :

Les analogues β sont obtenus par couplage de β -homo acides aminés à la place des acides aminés naturels.

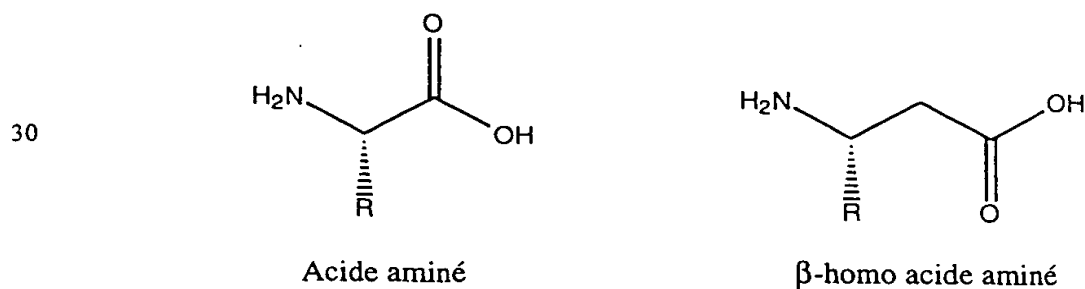


Schéma 4: Représentation schématique d'un acide aminé et d'un β -homo acide aminé

Le β -homo acide aminé est un acide aminé dans lequel un groupe méthylène a été inséré entre le carbone α et le carboxyle. La configuration du C α est inchangée (schéma 4). L'incorporation d'un β -homo acide aminé à la place d'un

acide aminé dans une séquence peptidique a pour conséquence d'allonger la chaîne peptidique des analogues peptidiques résultants. Ces analogues peptidiques plus longs peuvent être amenés à se tordre, à s'arc-bouter pour pénétrer dans la poche de liaison de la molécule de classe I du CMH. Dans ce cas, certaines chaînes latérales peuvent être déplacées latéralement ou leur orientation modifiée, ce qui peut entraîner des interactions préférentielles avec la molécule de classe I du CMH et/ou le TCR.

Les β -homo acides aminés sont obtenus par synthèse chimique en plusieurs étapes à partir des acides aminés N-protégés correspondants d'après le schéma suivant (Schéma 5).

L'acide aminé protégé sur sa fonction amine par le groupement Boc est dans un premier temps activé par la méthode aux anhydrides mixtes. L'acide aminé activé réagit avec le diazométhane pour conduire à la diazométhylcétone 2. Le réarrangement de Wolff de cette diazométhylcétone dans le méthanol, en présence du benzoate d'argent et de triéthylamine donne le β -homo méthylester de l'acide aminé protégé par le groupement Boc. Une saponification conduit au composé 3. La déprotection du Boc, suivie de la reprotction de la fonction amine par le groupement Fmoc sont les dernières étapes pour l'obtention du β -homo acide aminé, protégé par le Fmoc.

Le composé 4 est introduit par les méthodes conventionnelles de couplage des acides aminés au cours de la synthèse en phase solide en stratégie Fmoc. En pratique, 5 équivalents du mélange (4/BOP/HOBt) sont couplés pendant 20 mn dans le DMF. Le groupement Fmoc est déprotégé par la pipéridine à 50% dans le DMF et la synthèse est poursuivie d'une manière classique. Pour le décrochage et la déprotection du peptide ainsi que la purification et la caractérisation des peptides, voir paragraphe précédent.

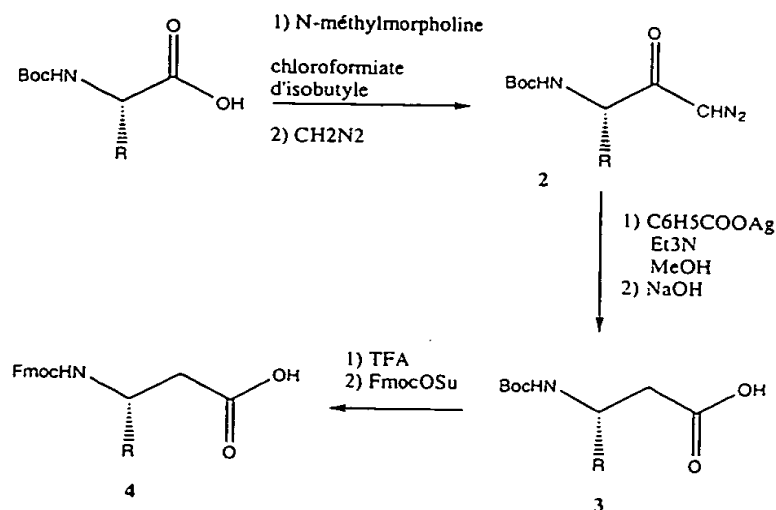


Schéma 5: Schéma de synthèse des Fmoc- β -homo acides aminés

Dans les tables 3 et 4 sont reportés les temps de rétention en RP-HPLC des peptides β sur une colonne C18 (gradient de 5 à 65% de B en 30 mn avec A= eau à 0,1% de TFA et B= ACN à 0,08% de TFA) ainsi que l'analyse de leur masse par MALDI.

5

Table 3: Séquences et caractéristiques des peptides β , analogues de Mart-1 27-35

		Séquences											
10		P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	Rt	masse	
	MART1 27-35	H- A	- A	- G	- I	- G	- I	- L	- T	- V	-OH	12.74	814.4
	β1	H-β-homoA	-A	- G	- I	- G	- I	- L	- T	- V	-OH	12.62	868.9*
	β2	H- A-β-homoA	- G	- I	- G	- I	- L	- T	- V	-OH	12.50	829.9	
15	β3	H- A	- A	-β-homoG	-I	- G	- I	- L	- T	- V	-OH	12.48	828.9
	β4	H- A	- A	- G	-β-homoI	-G	- I	- L	- T	- V	-OH	12.50	829.5
	β5	H- A	- A	- G	- I	-β-homoG	-I	- L	- T	- V	-OH	12.50	828.9
	β6	H- A	- A	- G	- I	- G	-β-homoI	-L	- T	- V	-OH	12.64	829.0
	β7	H- A	- A	- G	- I	- G	- I	-β-homoL	-T	- V	-OH	12.10	828.9
20	β8	H- A	- A	- G	- I	- G	- I	- L	-β-homoT	-V	-OH	11.92	829.1
	β9	H- A	- A	- G	- I	- G	- I	- L	- T	-β-homoV	-OH	12.68	829.2

* correspond à $M+K^+$

25 Table 4: Séquences et caractéristiques des peptides β , analogues de Mart-1 27-35 muté Leu²⁸

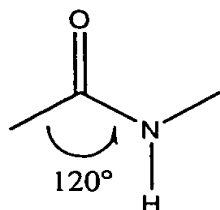
		Séquences										
		P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	Rt	masse
30												
	Mart-1 27-35 Leu ²⁸	H- A	- L	- G	- I	- G	- I	- L	- T	- V -OH	14.20	857.0
	b1	H-b-homoA	-L	- G	- I	- G	- I	- L	- T	- V -OH	14.47	871.2
	b2	H- A-b-homoL	- G	- I	- G	- I	- L	- T	- V -OH	14.16	870.9	
	b3	H- A	- L -b-homoG	-I	- G	- I	- L	- T	- V -OH	14.07	871.0	
35	b4	H- A	- L	- G -b-homoI	-G	- I	- L	- T	- V -OH	14.20	871.4	
	b5	H- A	- L	- G	- I -b-homoG	-I	- L	- T	- V -OH	14.14	871.3	
	b6	H- A	- L	- G	- I	- G -b-homoI	-L	- T	- V -OH	14.05	871.7	
	b7	H- A	- L	- G	- I	- G	- I -b-homoL	-T	- V -OH	13.78	871.3	
	b8	H- A	- L	- G	- I	- G	- I	- L -b-homoT	-V -OH	13.56	871.5	
40	b9	H- A	- L	- G	- I	- G	- I	- L	- T -b-homoV	-OH	14.14	871.4

3) Synthèse du peptide [Ile³⁰Ψ(CH₂CH₂)Gly³¹] Mart-1 27-35

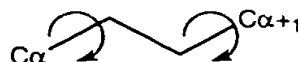
Cet analogue correspond à l'introduction d'une liaison carba à la place de la liaison peptidique entre les résidus Ile³⁰ et Gly³¹ de l'antigène Mart-1 27-35.

5

10



Liaison peptidique



Liaison carba

15

Schéma 6: Représentation schématique des liaisons peptidique et carba

20

25

La liaison carba confère une certaine flexibilité au pseudopeptide et ceci en raison de libres rotations autour des liaisons carbone-carbone. Ces libres rotations peuvent entraîner des changements dans l'orientation des chaînes latérales (portées par les carbones C_α et C_{α+1}, voir schéma 6) des deux acides aminés situés de part et d'autre de la liaison carba. Ces modifications dans l'orientation des chaînes latérales peuvent avoir de nombreuses implications dans les phénomènes de fixation, de reconnaissance et d'induction de signaux différents par rapport à ceux engendrés avec le peptide parent.

Le synthon Fmoc-IleΨ(CH₂CH₂)Gly-OH (4 de la Figure 7) est nécessaire à la synthèse de l'analogue [Ile³⁰Ψ(CH₂CH₂)Gly³¹] Mart-1 27-35. Ce synthon est obtenu par synthèse chimique en plusieurs étapes (schéma 7).

30

35

Le diméthylhydroxamate du Boc-β-homoIle-OH (1) (pour la synthèse des β-homo acides aminés, voir paragraphe précédent) est réduit par l'hydruire d'aluminium lithium à basse température (-25°C) dans le tétrahydrofurane afin d'obtenir l'aldéhyde correspondant (2). La réaction de Horner-Emmons en présence de triéthyl phosphonoacétate conduit au dipeptide éthylénique 3. L'hydrogénation de la double liaison, la saponification de l'ester, la déprotection et la reprotection de la fonction amine par le groupe Fmoc permettent d'obtenir le Fmoc-IleΨ(CH₂CH₂)Gly-OH (4).

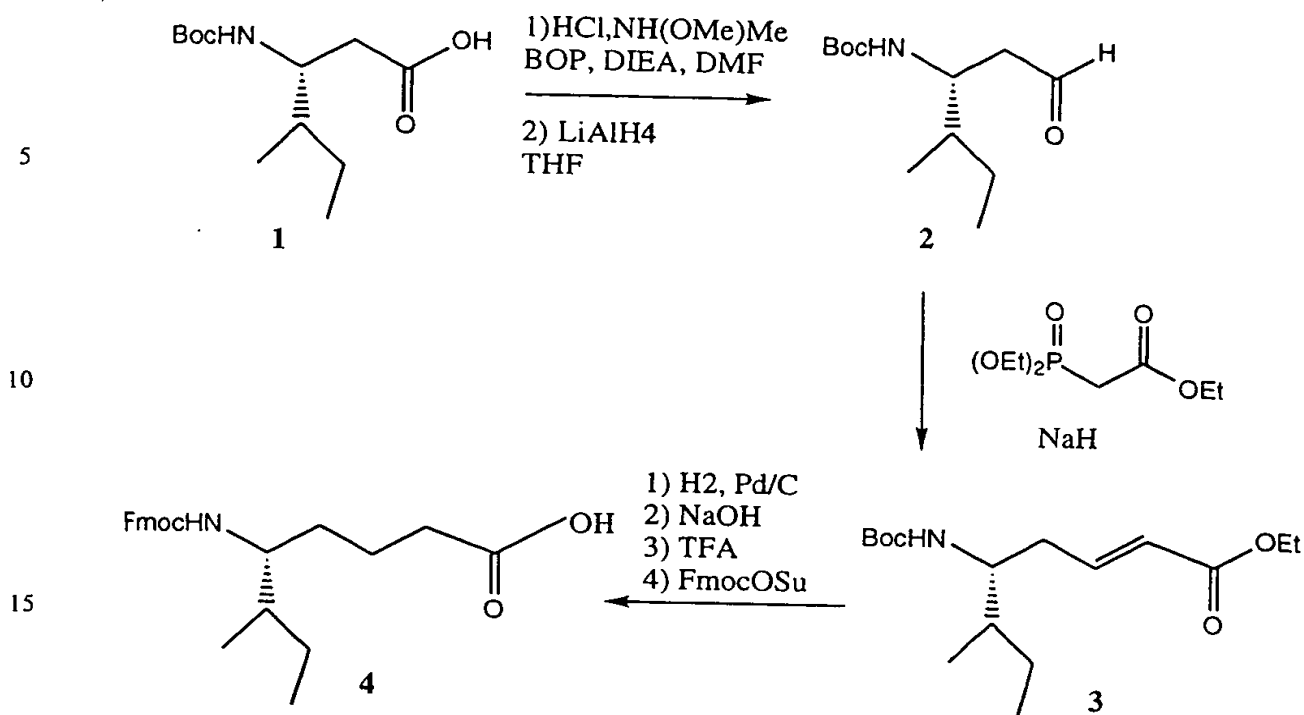


Schéma 7: Schéma de synthèse de Fmoc-Ile³⁰Ψ(CH₂CH₂)Gly³¹-OH (4)

Ce synthon (4) est incorporé en phase solide en chimie Fmoc. Le couplage de 5 équivalents du mélange (synthon/BOP/HOBt) est réalisé 2 fois de suite (20 mn chaque) dans le DMF. Le groupement Fmoc est déprotégé par la pipéridine à 50% dans le DMF. Les acides aminés suivants sont couplés de manière classique. Le peptide est déprotégé et décroché de la résine dans le TFA, précipité dans l'éther et purifié par RP-HPLC.

Le pseudopeptide [Ile³⁰Ψ(CH₂CH₂)Gly³¹] Mart-1 27-35 est obtenu avec une pureté de 100%. Son temps de rétention dans le gradient de 5 à 65% de B (avec A=eau à 0,1% de TFA et B=ACN à 0,08% de TFA) est de 13,49 mn. L'analyse de la masse du pseudopeptide par MALDI à l'aide du spectromètre Bruker Protein TOF donne la masse attendue $M+H^+$ 800.0.

B.2.) Synthèse d'analogues peptidiques comportant des acides aminés non protéinogéniques :

Synthèse du peptide analogue [Tic62] M58-66

Le tétrahydroisoquinolène-3-carboxylique acide est un analogue contraint de la phénylalanine. Il a été introduit en position 62 dans la séquence du peptide matrice de la grippe à la place de la phénylalanine naturelle afin d'étudier

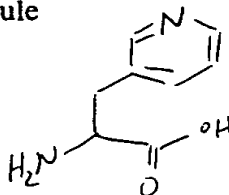
l'importance de l'orientation du groupe phényl dans l'interaction avec la molécule CMH et le TCR.

La synthèse du peptide analogue a été réalisée en chimie Fmoc classique. Le dérivé Fmoc-L-Tic-OH (commercialisé par la société Néosystem) a été introduit dans la chaîne en croissance en utilisant un procédé classique de couplage (BOP/HOBt/Fmoc-L-Tic-OH) en excès de 5 durant 20 mn dans du DMF. La déprotection du groupement Fmoc a été réalisée en plusieurs étapes en 50% pipéridine dans du DMF (4 traitements de 30 mn chacun séparés de 3 lavages de la résine en DMF). L'assemblage des acides aminés suivants n'a pas posé de problèmes particuliers. Après déprotection classique en TFA et purification HPLC, le peptide a été obtenu à 90% de pureté. La masse mesurée à l'aide du spectromètre Bruker Protein TOF était la masse attendue $M+H^+$ 978.9.

La synthèse du peptide analogue [Tic64]M58-66 est effectuée de la même façon que précédemment en introduisant le tétrahydroisoquinolène-3-carboxylique acide en lieu et place de la phénylalanine en position 64.

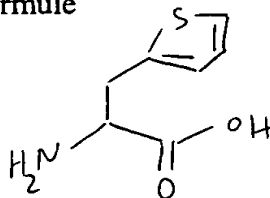
Toujours selon le même protocole :

les analogues 3-Pya62 et 3-Pya64 de M58-66 ont été obtenus en introduisant l'acide aminé de formule



en lieu et place de la phénylalanine en positions 62 et 64 respectivement ;

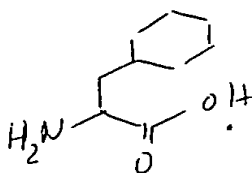
les analogues 2-Tha62 et 2-Tha64 de M58-66 ont été obtenus en introduisant l'acide aminé de formule



en lieu et place de la phénylalanine en positions 62 et 64 respectivement ;

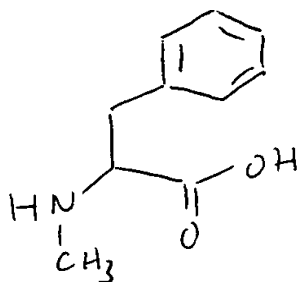
les analogues D-Phe62 et D-Phe64 de M58-66 ont été obtenus en introduisant la D-phénylalanine en lieu et place de la phénylalanine en positions 62 et 64 respectivement ;

les analogues Cha62 et Cha64 de M58-66 ont été obtenus en introduisant l'acide aminé de formule



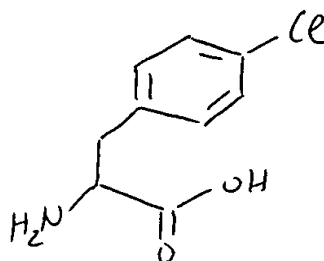
en lieu et place de la phénylalanine en positions 62 et 64 respectivement ;

. l'analogue N-MePhe62 de M58-66 a été obtenu en introduisant l'acide aminé de formule



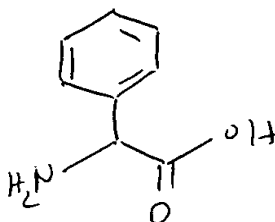
en lieu et place de la phénylalanine en position 62 ;

. les analogues pCl-Phe62 et pCl-Phe64 de M58-66 ont été obtenus en introduisant l'acide aminé de formule



en lieu et place de la phénylalanine en positions 62 et 64 respectivement ;

. les analogues Phg62 et Phg64 de M58-66 ont été obtenus en introduisant l'acide aminé de formule



en lieu et place de la phénylalanine en positions 62 et 64 respectivement.

II- Etude des propriétés biologiques des analogues peptidiques synthétisés:

A) Méthodologie :

1) Détection de l'association entre les peptides et les molécules d'histocompatibilité

1.1. Matériel

Sources de molécules d'histocompatibilité

Elles sont actuellement de deux types principaux: les cellules mutantes et les molécules d'histocompatibilité purifiées.

- La cellule mutante utilisée est la cellule humaine T2 (DeMars *et al.*, 1985; Ljunggren & Kärre, 1985 ; Salter & Cresswell, 1986) qui est un variant de la lignée T1 produite par fusion du lymphome T CEM et du lymphome B 721.174. Cette cellule qui est dépourvue de transporteurs de peptides contient des chaînes lourdes de molécules de classe I libres de peptides qui vont pouvoir accepter des peptides exogènes.

- Des molécules d'histocompatibilité de classe I purifiées par chromatographie d'affinité à partir de lignées de cellules B humaines transformées par l'EBV peuvent être également utilisées. Dans ce cas les peptides endogènes doivent être éliminés par un traitement avec de l'urée 1,5 M et de la soude 12,5 mM (pH 11.7) pendant 1 h à 4°C, suivi de leur élimination par une colonne de désalage (PD10, Pharmacia). Les molécules d'histocompatibilité sont immédiatement remises en présence des peptides à tester dans un tampon PBS avec 0,05 % Tween 20, 2 mM EDTA, 0,1% NP40 et 6 mM CHAPS, en présence de 2 µg/ml B2m pour faciliter la réassociation (Gnjatic *et al.*, 1995).

Peptides

Les peptides testés sont utilisés à des concentrations variant de 100 µM à 0,1 nM.

1.2. Protocole de l'assemblage

Des aliquots de 8×10^5 cellules T2 dans un volume de 64 µl, répartis dans des tubes microfuge Eppendorf, sont mis en présence d'un tampon de lyse contenant 10 mM PBS, pH 7.5, 1% NP40, des inhibiteurs de protéases (1 mM PMSF, 100 µM iodoacétamide, 2 µg/ml aprotinine, 10 µM leupeptine, 10 µM pepstatine et 10 µg/ml inhibiteur de trypsine). La lyse se fait en présence des peptides à tester pendant 30 mn ou 1 h à 37°C. Après élimination du matériel non solubilisé par une centrifugation à 15 000 rpm à 4°C, le surnageant est additionné de 140 µl de PBS contenant 0,05% de Tween 20, 3 mM d'azide de sodium, 1 mM PMSF et 10 mg/ml d'albumine bovine. Chaque échantillon est incubé pendant 20 h à 4°C dans 2 puits d'une plaque à microtitration de type Nunc, Maxisorb, préalablement recouverts d'un anticorps monoclonal (Parham & Brodsky, 1981) (10 µg/ml en PBS) qui reconnaît les molécules d'histocompatibilité ayant une(des) conformation(s) conforme(s) pour la présentation des peptides et semblable(s) à celle(s) présente(s) à la surface des cellules. La plaque recouverte d'anticorps est préalablement saturée par de l'albumine bovine à 10 mg/ml dans du PBS-Tween avant la mise de l'échantillon. Le second anticorps qui permet la détection de

l'assemblage des molécules d'histocompatibilité est dirigé contre la $\beta 2m$. Il est couplé soit à la biotine (NHS-LC biotin, Pierce) soit à la phosphatase alcaline (P-5521, Sigma) et est incubé à 2 $\mu\text{g/ml}$ pendant 1 h à 37°C. Dans le cas de l'emploi de la biotine, une incubation de 45 mn à 20-25°C avec de l'extravidine couplée à la phosphatase alcaline (E-2636, Sigma) est réalisée. L'activité de la phosphatase alcaline est mesurée en utilisant comme substrat du 4-méthyl-umbelliferyl phosphate (M-8883, Sigma) à 100 μM dans de la diéthanoline 50 mM, pH 9.5 avec du MgCl_2 1 mM. La lecture est faite à 340/460 nm à l'aide d'un cytofluorimètre 2300, Millipore.

1.3. Contrôle de la stabilité des complexes HLA/peptide

Le matériel utilisé est soit du HLA purifié, soit le lysat de la cellule T2. Avec le HLA purifié il faut éliminer les peptides endogènes comme décrit dans le paragraphe I-1 et le mettre en présence du peptide à tester en tube Eppendorf à 37°C pendant des temps variables de quelques mn à plusieurs jours. La phase suivante d'incubation sur plaque 96 puits (voir paragraphe I-2) avec l'anticorps anti-HLA (Parham & Brodsky, 1981) se fait pendant 1 h à 37°C. La révélation est classique (Teillaud *et al.*, 1982). Avec le lysat de la cellule T2, toutes les incubations se font également à 37°C après avoir ajouté tous les inhibiteurs de protéases.

1.4. Analyse de la conformation des complexes HLA/peptide par la résonance plasmonique de surface par le BIAcore

Cet appareil mesure à l'aide d'un faisceau de lumière réfléchi les interactions moléculaires se produisant en temps réel dans un flux de tampon continu. Les anticorps anti-HLA sont dilués à 25 $\mu\text{g/ml}$ dans du tampon acétate de Na pH 7.4 et fixés de façon covalente par leurs amines libres sur la matrice de dextran carboxyméthylée du "Sensor Chip CM5" activée avec 50 mM NHS et 200 mM EDC. L'injection se fait à 5 $\mu\text{l/mn}$ pendant 6 mn puis les groupements réactifs résiduels sont bloqués avec 30 μl de chlorure d'éthanolamine pH 8.5. Les complexes HLA/peptide formés comme indiqué dans le paragraphe I-1 sont injectés (30 μl) à 2 $\mu\text{l/mn}$ et vont pouvoir se lier à l'anticorps immobilisé. Les résultats sont exprimés en unités de résonance (RU) qui correspondent à l'angle de déviation du faisceau lumineux, déviation proportionnelle à la concentration de protéines au contact de la matrice. Le système peut être réutilisé après régénération en injectant 1 M éthanolamine pendant 2 mn. Des mesures cinétiques et d'affinité peuvent être réalisées.

2) Induction de lymphocytes T cytolytiques *in vitro*

Les cellules mononucléées issues du sang périphérique (PBMC), non purifiées, sont cultivées en RPMI 1640 et 10% SAB avec des antibiotiques, à la concentration de 2×10^6 /ml à raison de 2 ml par puits (plaque Costar 24 puits). A ces cellules sont ajoutés la toxine tétanique (TT) à 1 μ g/ml qui stimule les cellules T CD4+ et le peptide à tester en tant qu'inducteur de CTL à 1 μ g/ml. Au jour 3 ou 4, de l'IL-7 est ajoutée à 50 U/ml. Pour chaque culture, 10 réplicats sont traités de manière indépendante. Les cellules effectrices générées sont restimulées par des PBMC préincubées avec le peptide (50 μ g/ml pendant 4 h pour 10×10^6 cellules) puis irradiées à 6000 rads. Les cellules stimulatrices sont diluées à 10^6 /ml et 1 ml est ajouté par puits de culture après avoir enlevé 1 ml de surnageant. Le lendemain et 4 jours plus tard, de l'IL-2 (10 U/ml) et de l'IL-7 (50 U/ml) sont ajoutées. Les effecteurs sont restimulés tous les 7 à 10 jours de la même façon. Quand l'activité cytolytique est apparue l'IL-2 est ajoutée à 50 U/ml. La cytotoxicité peut être testée après 2 stimulations puis chaque semaine.

3) Analyse des fonctions effectrices

3.1. Test de cytolyse direct.

Les lignées T induites sont testées sur leur capacité à reconnaître le peptide inducteur présenté sur le HLA à la surface de cellules cibles, qui sont le plus fréquemment des cellules lymphoblastoïdes EBV. La cytolyse qui en résulte est déterminée par le test standard de 4 h de relargage de ^{51}Cr . Au Jour -3 ou -4 avant le test, l'ajout d'interleukines n'est pas fait car les cellules doivent être sevrées pour être en condition d'activation optimale. Pour les inductions primaires, la lyse ne peut être détectée avant 3 semaines. Les cellules cibles marquées pendant 1 h avec 10 μCi de ^{51}Cr sont préincubées avec le peptide (5 μ g/ml classiquement ou concentration variable). Après 2 lavages ces cellules sont réparties dans les puits d'une plaque de microtitration 96 puits à raison de 5000 par puits et les cellules effectrices sont ajoutées à des rapports variant de 1 à 100. Le relargage de ^{51}Cr (R) obtenu pendant l'incubation de 4 h à 37°C est mesuré. Le pourcentage de lyse est déterminé par la formule suivante:

$$(\text{R. expérimental} - \text{R. spontané} / \text{R. total} - \text{R. spontané}) \times 100$$

3.2. Analyse des interleukines

L'analyse de l'expression des gènes codant pour les interleukines est faite avec une technique de RT-PCR semi-quantitative. Des PBMC ou des cellules purifiées CD8+ (1 à 2×10^6) sont mises en culture dans des plaques 24 puits et stimulées avec soit des anticorps monoclonaux anti-CD3+ en présence de 100 nM

de Phorbol Myristate Acetate (PMA) avec des PBMC autologues irradiés et sensibilisés ou non pendant 1 h 30 avec un peptide dont la reconnaissance est restreinte par les molécules du CMH. Pour les différentes interleukines, au bout de 12 à 14 h de stimulation (ou de 3, 10 et 24 h pour l'analyse cinétique de l'apparition des ARNm), les cellules sont récupérées et l'ARN total extrait par la technique au RNazol (Bioprobe, Montreuil, France). L'ARN (1 à 2 mg) est rétrotranscrit avec la superscript II (Gibco BRL). Les cDNA synthétisés sont dilués au 1/5 avec de l'eau et leur concentration quantifiée par PCR compétitive avec un plasmide (pQB.2) contenant la séquence de la B actine (produit de 237 pb gracieusement fourni par D. Shire). La réaction de PCR est faite en présence de 10 mM de Tris-HCl, 50 mM de KCl, 1.5 mM de MgCl₂, 0.2 mM de chaque dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 0.4 mM d'amorce sense et antisense, 2 U de Taq polymérase (Promega). L'amplification est réalisée en commençant par une dénaturation à 94°C, 5 mn, puis par 30 cycles à 94°C, 30 s, 55°C, 30 s, 72°C, 30 s, et une dernière élongation à 72°C, 10 mn, dans un thermostat régulé (Perkin Elmers 9600). L'analyse de l'IL-2, de l'IL-4 et de l'IFN- γ est faite dans les mêmes conditions que pour la B-actine, excepté le nombre de cycles qui varie entre 30 et 40. La quantification relative est réalisée par PCR compétitive.

20 B) Résultats :

1) Analogues peptidiques du peptide M58-66 comportant des acides aminés non protéinogéniques :

1.1. Liaison sur la molécule A2 des peptides de la série M58-66 :

25 Les résultats sont représentés sur la figure 1 (figures 1A à 1C).

Les peptides ont été incubés à différentes concentrations à 4°C 18 h en présence de molécules HLA-A2 dénaturées et de β 2 microglobuline. Les complexes stables HLA-A2/peptide formés à 4°C sont capturés à l'Ac BB7.2 adsorbé sur plaque et révélés par un second Ac anti β 2 microglobuline couplé à la phosphatase alcaline. La quantité de complexes formés HLA-A2/peptide est proportionnelle à l'intensité de fluorescence détectée au cytofluor. NP 383-391 est un peptide contrôle négatif. 0. peptide correspond au bruit de fond en absence de peptide. U.F. : unité arbitraire de fluorescence.

35 Seules deux modifications affectent la liaison de ces peptides modifiés sur la molécule HLA-A2 : modification par la D-Phényl en position 62 ([D-Phe62]M58-66) et en position 64 ([D-Phe64]M58-66).

1.2. Capacité de ces peptides à induire la lyse des cellules cibles T2 par une lignée de cellules T cytotoxiques (CTL) spécifique de M58-66 et restreinte par la molécule HLA-A2.1.

Les résultats sont représentés sur la figure 2 (figures 2A à 2D).

Les cellules cibles T2 A2 ont été chromées (Cr51), puis incubées pendant 2 h avec 1 $\mu\text{g/ml}$ de peptide. Après lavage, les cibles (5000 par puits) ont été incubées pendant 4 h avec la lignée CTL à un rapport 10 cellules effectrices (E)/1 cellule cible (C). La lyse spécifique est exprimée en % de lyse en fonction de la concentration en peptide incubée avec les cibles.

Les modifications Phg-62 et 64, DPhe-62 et 64, Cha62 et 64, Tic 62 et 64 affectent la reconnaissance des lymphocytes T cytolytiques spécifiques du peptide M58-66.

1.3. Dose réponse.

Les résultats sont représentés sur la figure 3 (figures 3A et 3B).

Les cellules cibles T2 A2 ont été chromées (Cr51), puis incubées pendant 1 h avec différentes concentrations de peptide. Après lavage, les cibles (5000 par puits) ont été incubées pendant 4 h avec la lignée CTL à un rapport 10E/1C. La lyse spécifique est exprimée en % de lyse en fonction de la concentration en peptide incubée avec les cibles.

Les lymphocytes T cytolytiques spécifiques du peptide M58-66 ont une affinité plus faible pour les peptides modifiés.

2) Analogues peptidiques de Mart-1 comportant une liaison du type β -homologation :

2.1. Liaison sur la molécule A2.

Les résultats sont représentés sur la figure 4 (figures 4A et 4B).

Les différents peptides sont comparés pour leur capacité à se lier à la molécule HLA-A2.1 purifiée.

Les peptides ont été incubés à différentes concentrations à 4°C 18 h en présence de molécules HLA-A2 dénaturées et de $\beta 2$ microglobuline. Les complexes stables HLA-A2/peptide formés à 4°C sont capturés à l'Ac BB7.2 adsorbé sur plaque et révélés par un second Ac anti $\beta 2$ microglobuline couplé à la phosphatase alcaline. La quantité de complexes formés HLA-A2/peptide est proportionnelle à l'intensité de fluorescence détectée au cytofluor. (U.F. : unité arbitraire de fluorescence).

NP est un peptide de la nucléoprotéine du virus de l'influenza qui ne se lie pas à la molécule HLA-A2 (contrôle négatif).

A part le peptide $\beta 4$ homo qui se lie mieux que le peptide parent, les autres peptides β homo ont une affinité intermédiaire à faible par rapport au peptide Mart-1.

5 2.2. Capacité de ces peptides à induire la lyse des cellules cibles T2 par 3 clones T spécifiques de Mart-1 restreints par la molécule HLA-A2.1.

Les résultats sont représentés sur la figure 5.

Les cellules cibles T2 A2 ont été chromées (Cr51), puis incubées pendant 2 h avec 1 $\mu\text{g/ml}$ de peptide. Après lavage, les cibles (1500 par puits) ont été
10 incubées pendant 4 h avec les différents clones T (LT8, LT11, LT12) à un rapport 3 cellules effectrices/1 cellule cible (E/T). La lyse spécifique est exprimée en % de lyse.

Les cellules cibles T2 incubées avec le peptide parent Mart-1 sont lysées à 90% par les trois clones cytolytiques (LT8, LT11 et LT12) spécifiques de ce
15 peptide. En absence de peptide (0), aucune lyse n'est détectée. Seul le peptide $\beta 4$ homo est capable d'induire une activité de lyse similaire au peptide parent pour un seul clone (LT12).

2.3. Dose réponse.

20 Les résultats sont représentés sur la figure 6.

Les cellules cibles T2 A2 ont été chromées (Cr51), puis incubées pendant 2 h avec différentes concentrations de peptide. Après lavage, les cibles (1500 par puits) ont été incubées pendant 4 h avec le clone T LT12 à un rapport 3E/1C. La lyse spécifique est exprimée en % de lyse en fonction de la concentration en
25 peptide incubée avec les cibles.

Le clone T LT12 a une affinité plus faible pour le peptide $\beta 4$ que vis-à-vis du peptide Mart-1.

30 3) Analogues peptidiques du peptide Mart-1 comportant une liaison -CH₂-NH-.

3.1. Liaison sur la molécule A2 des peptides de la série Mart-1 réduit.

Les résultats sont représentés sur la figure 7 (figures 7A et 7B).

Complexes formés peptides/HLA-A2 en fonction de la concentration en
35 peptide :

Les peptides ont été incubés à deux concentrations différentes (10^{-4} M et 10^{-6} M) à 4°C 18 h en présence de molécules HLA-A2 dénaturées et de $\beta 2$ microglobuline. Les complexes stables HLA-A2/peptide formés à 4°C sont capturés à l'Ac BB7.2 (spécifique de cette molécule de classe I et adsorbé au fond

des puits) et révélés par un second Ac anti $\beta 2$ microglobuline couplé à la phosphatase alcaline. La quantité de complexes formés HLA-A2/peptide est proportionnelle à l'intensité de fluorescence détectée au cytofluor. (U.F. : unité arbitraire de fluorescence).

5 Les peptides ψ 1-2 à 4-5 ont une affinité intermédiaire à faible par rapport au peptide Mart-1. Les peptides ψ 4-5 à 8-9 se lient très faiblement à la molécule A2.1 purifiée.

10 3.2. Capacité des peptides de la série Mart réduit à induire la lyse des cellules cibles T2 par 3 clones T spécifiques de Mart restreints par la molécule HLA-A2.1.

Les résultats sont représentés sur la figure 8.

Test de lyse :

15 Des cellules cibles T2 A2 ont été chromées (Cr51), puis incubées pendant 2 h avec 1 $\mu\text{g/ml}$ de peptide. Après lavage, les cibles (1500 par puits) ont été incubées pendant 4 h avec les différents clones T (LT8, LT11, LT12) à un rapport 3 cellules effectrices/1 cellule cible (E/T). La lyse spécifique est exprimée en % de lyse en fonction des différents clones testés.

20 Les cellules cibles T2 incubées avec le peptide parent Mart-1 sont lysées à 90% par les trois clones cytolytiques (LT8, LT11 et LT12) spécifiques de ce peptide. En absence de peptide (0), aucune lyse n'est détectée. Seuls les peptides ψ 2-3, ψ 5-6 sont capables d'induire une activité de lyse similaire au peptide parent pour un seul clone (LT8 et LT12 respectivement). ψ 7-8 induit une activité de lyse plus faible détectée uniquement avec le clone LT12.

25

3.3. Dose réponse des différents peptides qui induisent une lyse avec les clones LT8 et LT12.

Les résultats sont représentés sur la figure 9 (figures 9A et 9B).

Test de lyse :

30 Des cellules cibles T2 A2 ont été chromées (Cr51), puis incubées pendant 2 h avec différentes concentrations de peptide. Après lavage, les cibles (1500 par puits) ont été incubées pendant 4 h avec les différents clones T (LT8, LT12) à un rapport 3E/1C. La lyse spécifique est exprimée en % de lyse en fonction de la concentration en peptide incubée avec les cibles.

35 Les peptides ψ 2-3 et ψ 5-6 ont une dose réponse comparable à celle du peptide parent alors que le peptide ψ 7-8 n'induit la lyse que faiblement même à concentration forte en peptide. Ce résultat suggère que la modification introduite diminue l'affinité du TCR (récepteur T) du clone LT8 pour ce peptide.

4) Analogues peptidiques du peptide M58-66 comportant une liaison -CH₂-NH-.

4.1. Liaison sur la molécule A2 des peptides de la série M58-66 réduit.

5 Les résultats sont représentés sur la figure 10 (figures 10A et 10B).

Les peptides ont été incubés à différentes concentrations à 4°C 18 h en présence de molécules HLA-A2 dénaturées et de β 2 microglobuline. Les complexes stables HLA-A2/peptide formés à 4°C sont capturés à l'Ac BB7.2 adsorbé sur plaque et révélés par un second Ac anti β 2 microglobuline couplé à la phosphatase alcaline. La quantité de complexes formés HLA-A2/peptide est proportionnelle à l'intensité de fluorescence détectée au cytofluor. U.F. : unité arbitraire de fluorescence.

15 Les peptides Mart-1 modifiés par réduction ont une affinité intermédiaire pour la molécule HLA-A2. La réduction en position 2-3 et 8-9 rend la liaison indétectable pour le clone étudié.

4.2. Capacité des peptides de la série réduit M58-66 à induire la lyse des cellules cibles T2 par une lignée CTL induite par M58-66 et restreinte par la molécule HLA-A2.1.

20 Les résultats sont représentés sur la figure 11.

Les cellules cibles T2 A2 ont été chromées (Cr51), puis incubées pendant 1 h avec 1 μ g/ml de peptide. Après lavage, les cibles (5000 par puits) ont été incubées pendant 4 h avec la lignée CTL à un rapport 10E/1C. La lyse spécifique est exprimée en % de lyse.

25 La réduction en position 2-3 et 5-6 n'affecte pas la reconnaissance du peptide par les lymphocytes T cytolytiques spécifiques du peptide M58-66.

LEGENDE DES FIGURES :

30 - Figure 1 : étude de la liaison aux molécules du CMH (HLA-A2) des analogues peptidiques du peptide M58-66 comportant des acides aminés non protéinogéniques : les concentrations des analogues peptidiques (10^{-4} à 10^{-10} M) sont indiquées en abscisse, les unités de fluorescence sont indiquées en ordonnée :

35 . Figure 1A : étude de la liaison des analogues peptidiques [Tic62]M58-66 (encore désigné M58-66 Tic62 ou Tic62), [3-Pya62]M58-66 (3-Pya62), [2-Tha62]M58-66 (2-Tha62), [D-Phe62]M58-66 (D-Phe62), [Tic64]M58-66 (Tic64),

. Figure 1B : étude de la liaison des analogues peptidiques [3-Pya64]M58-66 (3-Pya64), [2-Tha64]M58-66 (2-Tha64), [D-Phe64]M58-66 (D-Phe64), [Cha62]M58-66 (Cha62), [N-MePhe62]M58-66 (N-MePhe62),

. Figure 1C : liaison des analogues peptidiques [pCl-Ph62]M58-66 (pCl-Phe62), [Phg62]M58-66 (Phg62), [Cha64]M58-66 (Cha64), [pCl-Phe64]M58-66 (pCl-Phe64), [Phg64]M58-66 (Phg64), en comparaison avec le peptide M58-66, le peptide de contrôle négatif NP383-391, et une solution ne contenant aucun peptide (0 peptide).

. Figure 2 : étude de l'effet d'analogues peptidiques de M58-66 comportant des acides aminés non protéinogéniques sur la lyse d'une lignée de cellules cibles T2 par une lignée de cellules T cytotoxiques spécifiques de M58-66 : le pourcentage de lyse est indiqué en ordonnée et le rapport E/T (cellules effectrices/cellules cibles) est représenté en abscisse :

. Figure 2A : effet des analogues Tic62 et Tic64 sur la lyse des cellules T2,

. Figure 2B : effet des analogues D-Phe62, D-Phe64, Cha62, Cha64 sur la lyse des cellules T2,

. Figure 2C : effet des analogues 3-Pya62, 3-Pya64, 2-Tha62, 2-Tha64 sur la lyse des cellules T2,

. Figure 2D : effet des analogues pCl-Phe64, Phg64, pCl-Phe62, Phg62 sur la lyse des cellules T2,

en comparaison avec les effets du peptide M58-66, et d'une solution ne contenant pas de peptide (0 peptide).

. Figure 3 : étude de la réponse des cellules T cytotoxiques en fonction de la concentration d'analogues peptidiques du peptide M58-66 comportant des acides aminés non protéinogéniques : le pourcentage de lyse est indiqué en ordonnée, et la concentration des peptides en abscisse :

. Figure 3A : étude en fonction de la concentration de pCl-Phe62 et pCl-Phe64,

. Figure 3B : étude en fonction de la concentration de 2-Tha62 et de 2-Tha64,

en comparaison avec la concentration de M58-66.

. Figure 4 : étude de la liaison aux molécules du CMH (HLA-A2) des analogues peptidiques du peptide Mart-1 comportant une liaison du type β -homologation ; les concentrations des analogues peptidiques (10^{-5} à 10^{-7} M) sont indiquées en abscisse, les unités de fluorescence sont indiquées en ordonnée :

. Figure 4A : étude de la liaison des analogues β 1 homo (B1), β 2 homo (B2), β 3 homo (B3), β 4 homo (B4),

. Figure 4B : étude de la liaison des analogues β 5 homo (B5), β 6 homo (B6), β 7 homo (B7), β 8 homo (B8), β 9 homo (B9),

en comparaison avec le peptide Mart-1 (Mart), et un peptide de contrôle négatif (NP).

- Figure 5 : étude de l'effet d'analogues peptidiques du peptide Mart-1 comportant une liaison du type β -homologation sur la lyse des cellules cibles T2 par 3 clones de cellules T cytotoxiques (LT8, T11 et LT12) spécifiques de Mart-1 : le pourcentage de lyse est indiqué en ordonnée, et les analogues peptidiques B1 à B9 sont indiqués en abscisse, en comparaison avec Mart-1 et une solution sans peptide (0).

- Figure 6 : étude de la réponse des cellules T cytotoxiques en fonction de la concentration de l'analogue β 4 homo de Mart-1, en comparaison avec Mart-1 : le pourcentage de lyse est indiqué en ordonnée, et la concentration en peptide ($\mu\text{g/ml}$) en abscisse.

- Figure 7 : étude de la liaison aux molécules du CMH (HLA-A2) des analogues peptidiques du peptide Mart-1 comportant une liaison $-\text{CH}_2\text{-NH-}$ (analogues réduits) : les peptides aux concentrations de 10^{-6} M ou de 10^{-4} M sont indiqués en abscisse, et les unités de fluorescence sont indiquées en ordonnée :

. Figure 7A : étude de la liaison des peptides $\Psi(1-2)\text{Mart-1}$ (représenté par 1-2), $\Psi(2-3)\text{Mart-1}$ (2-3), $\Psi(3-4)\text{Mart-1}$ (3-4), $\Psi(4-5)\text{Mart-1}$ (4-5),

. Figure 7B : étude de la liaison des peptides $\Psi(5-6)\text{Mart-1}$ (5-6),

$\Psi(6-7)\text{Mart-1}$ (6-7), $\Psi(7-8)\text{Mart-1}$ (7-8), $\Psi(8-9)\text{Mart-1}$ (8-9),

en comparaison avec Mart-1.

- Figure 8 : étude de l'effet des analogues réduits 1-2 à 8-9 de Mart-1 sur la lyse de cellules T2 par 3 clones de cellules T (LT8, LT11 et LT12) spécifiques de Mart-1 : le pourcentage de lyse est indiqué en ordonnée, et les analogues peptidiques 1-2 à 8-9 sont indiqués en abscisse, en comparaison avec Mart-1 et une solution sans peptide (0).

- Figure 9 : étude de la réponse des cellules T cytotoxiques en fonction de la concentration d'analogues réduits de Mart-1 : le pourcentage de lyse est indiqué en ordonnée, et la concentration des peptides en abscisse ($\mu\text{g/ml}$) :

. Figure 9A : étude en fonction de la concentration des analogues 2-3 et 7-8,

. Figure 9B : étude en fonction de la concentration de l'analogue 5-6,

en comparaison avec la concentration de Mart-1.

- Figure 10 : étude de la liaison aux molécules du CMH (HLA-A2) des analogues peptidiques du peptide M58-66 comportant une liaison $-\text{CH}_2\text{-NH-}$ (analogues réduits) : les concentrations des peptides (10^{-10} à 10^{-4} M) sont indiquées en abscisse, et les unités de fluorescence sont indiquées en ordonnée :

. Figure 10A : étude de la liaison des peptides $\Psi(1-2)\text{M58-66}$ (1-2),

$\Psi(2-3)\text{M58-66}$ (2-3), $\Psi(3-4)\text{M58-66}$ (3-4), $\Psi(4-5)\text{M58-66}$ (4-5),

. Figure 10B : étude de la liaison des peptides $\Psi(5-6)\text{M58-66}$ (5-6),

$\Psi(6-7)\text{M58-66}$ (6-7), $\Psi(7-8)\text{M58-66}$ (7-8), $\Psi(8-9)\text{M58-66}$ (8-9),

en comparaison avec M58-66, et un peptide muté (GIL) de M58-66 portant la mutation GLL \rightarrow GIL [M58-66 (GIL)],

- 5 - Figure 11 : étude de l'effet des analogues réduits 1-2 à 8-9 de M58-66 sur la lyse de cellules T2 par un clone de cellules T spécifique de M58-66 : le pourcentage de lyse est indiqué en ordonnée, et le rapport cellules effectrices/cellules cibles (E/T) est indiqué en abscisse, en comparaison avec M58-66, M58-66 muté (GLL) et une solution sans peptide (0).

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 5 1. Bohnstedt A.C. *et al.* Tetrahedron Lett. 1993, 34:5217-5220.
2. Breton P. *et al.* Int. J. Peptide Protein Res. 1990, 35:346-351.
3. Chorev M. & Goodman M. Acc. Chem.. Res. 1993, 26:266-273.
- 10 4. DeMars *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1985, 82:8183.
5. Evans B.E. *et al.* J. Org. Chem. 1985, 50:4615-4625.
6. Gnjjatic S. *et al.* Eur. J. Immunol. 1995, 25:1638-1642.
- 15 7. Gonzalez-Muniz R. *et al.* J. Med. Chem. 1995, 38:1015-1021.
8. Goodman M. & Chorev M. Acc. Chem. Res. 1979, 12:1-7.
- 20 9. Harbeson S.L. & Rich D.H. J. Med. Chem. 1989, 32:1378-1392.
10. Hann M.M. *et al.* J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1982, 1:307-314.
11. Kempf D.J. *et al.* Int. J. Peptide Protein Res. 1991, 38:237-241.
- 25 12. Ljunggren H.G. & Kärre K. J. Exp. Med. 1985, 162:1745.
13. Martinez J. *et al.* J. Med. Chem. 1985, 28:1874.
- 30 14. Parham P. & Brodsky F.M. J. Immunol. 1981, 3:277.
15. Rodriguez M. *et al.* Tetrahedron Lett. 1990a, 31:5153-5156.
16. Rodriguez M. *et al.* Tetrahedron Lett. 1990b, 31:7319-7322.
- 35 17. Salter R.D. & Cresswell P. EMBO J. 1986, 5:943.
18. Sasaki Y. & Coy D.H. Peptides 1987, 8:119-121.

19. Shemyakin M.M. *et al.* Angew Chem. Internat. Edit. 1969, 8:492-499.

20. Szelke M. *et al.* Nature 1982, 299:555-557.

5 21. Teillaud *et al.* Immunogenetics 1982, 15:377.

22. TenBrink R.E. J. Org. Chem. 1987, 52:418-422.

23. Wuts P.G.M. *et al.* J. Org. Chem. 1992, 57:6696-6700.

10

REVENDEICATIONS

1. Utilisation d'analogues peptidiques de peptides parents, ces peptides parents étant le cas échéant issus de protéines exogènes ou endogènes, lesdits peptides parents pouvant interagir avec des molécules du CMH dans le cadre de pathologies chez l'homme ou l'animal, lesdits analogues étant caractérisés en ce qu'ils correspondent auxdits peptides parents dans lesquels :

- au moins une liaison peptidique -CO-NH- de la chaîne peptidique, est modifiée, à l'exception des modifications du type rétro, ou rétro-inverso, ou

- au moins un acide aminé de la chaîne peptidique, est substitué par un acide aminé non protéinogénique, ou

- au moins une liaison peptidique -CO-NH- de la chaîne peptidique, est modifiée, et au moins un acide aminé de ladite chaîne peptidique est substitué par un acide non protéinogénique,

pour :

- la préparation d'un médicament destiné à la prévention ou au traitement des pathologies susmentionnées, ou

- la préparation d'une composition destinée au diagnostic *in vivo* des pathologies susmentionnées, ou à l'évaluation *in vivo* de la réponse immunitaire dans le cadre des pathologies susmentionnées, par mise en oeuvre d'une réaction cutanée d'hypersensibilité par injection intradermique de ladite composition, ou

- la mise en oeuvre d'une méthode de diagnostic *in vitro* desdites pathologies.

2. Analogues peptidiques de peptides parents, ces peptides parents étant le cas échéant issus de protéines exogènes ou endogènes, lesdits peptides parents pouvant interagir avec des molécules du CMH dans le cadre de pathologies chez l'homme ou l'animal, lesdits analogues étant caractérisés en ce qu'ils correspondent auxdits peptides parents dans lesquels :

- au moins une liaison peptidique -CO-NH- de la chaîne peptidique est modifiée, à l'exception des modifications du type rétro, ou rétro-inverso, ou

- au moins un acide aminé de la chaîne peptidique, est substitué par un acide aminé non protéinogénique, ou

- au moins une liaison amide -CO-NH- de la chaîne peptidique, est modifiée, et au moins un acide aminé de la chaîne peptidique, est substitué par un acide non protéinogénique.

3. Analogues peptidiques selon la revendication 2, caractérisés en ce que le nombre de résidus aminoacyles protéinogéniques ou non, et reliés par une liaison

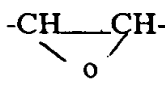
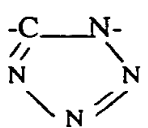
modifiée ou non, est compris entre environ 5 et environ 20, de préférence entre 8 et 12 pour les analogues peptidiques se liant aux molécules du CMH de classe I, et de préférence entre 8 et 16 pour les analogues peptidiques se liant aux molécules du CMH de classe II.

5

4. Analogues peptidiques selon la revendication 2 ou la revendication 3, caractérisés en ce que l'une au moins des liaisons peptidiques -CO-NH- de la chaîne peptidique du peptide parent est remplacée par une liaison différente de la liaison -CO-NH-, ladite liaison différente étant notamment choisie parmi les

10

suivantes :

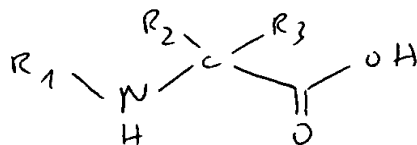
- CH₂-NH- (méthylène amino) ;
- CH₂-CH₂- (carba) ;
- CO-CH₂- (cétométhylène) ;
- CH₂-O- (méthylène-oxy) ;
- 15 -CHOH-CH₂- (hydroxyéthylène) ;
- CHOH-CHOH- (di-hydroxyéthylène) ;
- CH=CH- (E ou Z oléfine) ;
- CHCN-NH- (cyanométhylène amino) ;
- S-CH₂- (thiométhylène) ;
- 20 -CH₂-S- (méthylène thio) ;
- CS-NH- (thioamide) ;
- PO₂-NH- (phosphonamide) ;
- CHOH- (hydroxyméthylène) ;
- NH-CO-NH- (urée) ;
- 25  (oxirane) ;
-  (tétrazole) ;
- 30 -CH₂-CO-NH- (β-homologation) ;
- CHOH-CH₂-NH- (hydroxyéthylène amino) ;
- CO-NH-NH- (hydrazino).

35

5. Analogues peptidiques selon la revendication 4, caractérisés en ce que l'une au moins des liaisons amides -CO-NH- de la chaîne peptidique ou peptide parent est remplacée par une liaison méthylène amino, ou du type β-homologation, ou carba, ou cétométhylène, ou cyanométhylène amino, ou hydroxyéthylène amino.

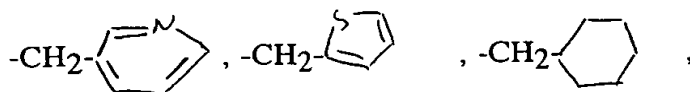
6. Analogues peptidiques selon l'une des revendications 2 à 5, caractérisés en ce que l'un au moins des acides aminés de la chaîne peptidique du peptide parent, est substitué par un acide aminé non protéinogénique, ledit acide aminé non protéinogénique étant choisi notamment parmi les acides aminés suivants:

- les acides aminés de configuration D,
- les acides α -aminés de formule générale :



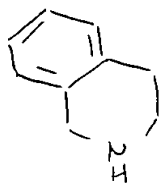
dans laquelle :

- R_1 , R_2 et R_3 , représentent indépendamment les uns des autres : un atome d'hydrogène, un hydroxyle, un radical alkyle de 1 à 25 atomes de carbone, un radical contenant un groupe allyle et ayant de 3 à 25 atomes de carbone, un radical contenant un ou plusieurs cycles aromatiques ou non, notamment un groupe aryle, et ayant de 6 à 25 atomes de carbone, et notamment les groupes suivants : $-CH_3$ (méthyl), $-CH_2CH_3$ (éthyl), $-(CH_2)_4-CH_3$, $-CH(CH_3)_2$ (isopropyl), $-C(CH_3)_3$ (tertibutyl), $-\Phi$ (phényl), $-CH_2\Phi$ (benzyl), $-CH_2\Phi Cl$ (para-chlorobenzyl), $-CH_2-CH_2\Phi$ (2-phényl-éthyl), $-CH_2CHCH_2$ (alkyl), méthylfluorényl, $-CH_2CONH_2$ (glycolamide), $-CH_2CON\Phi_2$ (benzhydrylglycolamide), $-CHOH\Phi$,

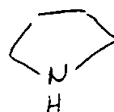


étant entendu que l'un des deux groupes R_2 et R_3 peuvent représenter une chaîne latérale d'acides aminés naturels lorsque soit R_1 , soit l'autre des deux groupes R_2 et R_3 ne représentent pas un atome d'hydrogène,

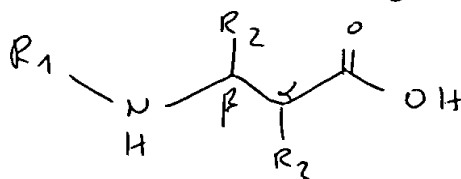
- le cas échéant, R_1 , R_2 , C_α et N forment un hétérocycle de 4 à 8 atomes de carbone, aromatique ou non, le cas échéant substitué, notamment un hétérocycle de formule :



ou



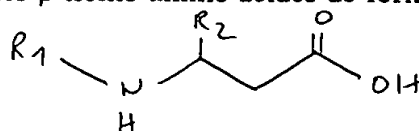
- les acides β -aminés de formule générale :



dans laquelle R_1 , R_2 et R_3 , indépendamment les uns des autres représentent une chaîne latérale d'un acide aminé naturel, ou sont tels que définis ci-dessus,

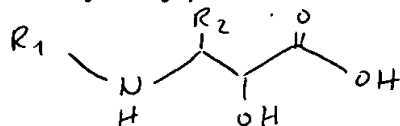
notamment :

. les β -homo amino acides de formule :



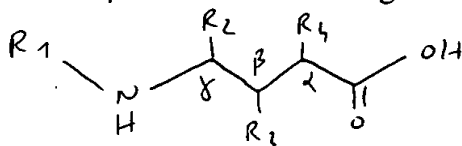
dans laquelle R_1 et R_2 , sont tels que définis ci-dessus, ou

. les α -hydroxy β -homo amino acides de formule :



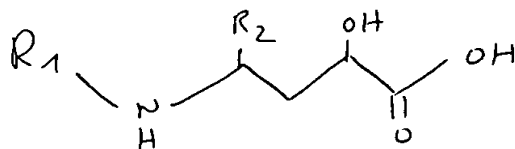
dans laquelle R_1 et R_2 , sont tels que définis ci-dessus,

- les acides γ -aminés de formule générale :



dans laquelle R_1 , R_2 , R_3 et R_4 représentent indépendamment les uns des autres une chaîne latérale d'un acide aminé naturel, ou R_1 , R_2 et R_3 , sont tels que définis ci-dessus, et R_4 a la même signification que celle donnée ci-dessus pour R_1 , R_2 et R_3 ,

notamment les dérivés de statine de formule :



7. Analogues peptidiques selon l'une des revendications 2 à 6, caractérisés en ce qu'ils sont sélectionnés parmi ceux susceptibles :

- d'une part d'être reconnus par les molécules du CMH et de s'associer avec ces dernières, notamment par mise en oeuvre de la méthode suivante :

5 • incubation, de l'analogue peptidique en présence de molécules du CMH, provenant de la lyse de cellules humaines ou animales, ou purifiées notamment par chromatographie d'affinité à partir de lignées cellulaires humaines ou animales, sur un support solide recouvert d'un premier anticorps, notamment monoclonal, reconnaissant spécifiquement les molécules du CMH dans leur
10 conformation dépendante de leur liaison audit analogue peptidique,

 • addition sur le support solide précédent d'un deuxième anticorps marqué, notamment par couplage à un marqueur radioactif, enzymatique ou fluorescent, ledit anticorps marqué reconnaissant spécifiquement soit les molécules
15 du CMH dans leur conformation dépendante de leur liaison à l'analogue peptidique, soit une molécule se liant elle-même spécifiquement aux molécules du CMH dans leur conformation susmentionnée, notamment la $\beta 2$ -microglobuline reconnaissant spécifiquement les molécules du CMH de classe I,

 • détection, après rinçage du support solide, de l'éventuelle présence du deuxième anticorps marqué resté fixé sur le support solide, témoignant d'un effet
20 de reconnaissance et d'association entre les molécules du CMH et l'analogue peptidique étudié,

- et, d'autre part, de former un complexe avec lesdites molécules du CMH, dont la stabilité peut être évaluée par mise en oeuvre d'une méthode de suivi dans le temps de la liaison établie entre l'analogue peptidique et les
25 molécules du CMH, cette méthode étant avantageusement effectuée selon un protocole identique à la méthode précédente, mais dans laquelle l'étape d'incubation de l'analogue peptidique en présence des molécules du CMH sur le support solide recouvert dudit premier anticorps, se fait pendant des temps variables de quelques minutes à plusieurs jours.

30

8. Analogues peptidiques selon l'une des revendications 2 à 7, caractérisés en ce qu'ils sont sélectionnés parmi ceux susceptibles :

35 - d'induire *in vitro* l'apparition et la croissance de lymphocytes T cytotoxiques à partir de cellules humaines ou animales, notamment à partir de cellules mononucléées issues du sang périphérique (PBMC), en présence de facteurs nécessaires à la croissance et la différenciation des cellules T cytotoxiques,

 - d'induire *in vitro* la cytolyse par des lymphocytes T cytotoxiques, de cellules cibles présentant à leur surface l'analogue peptidique associé aux

molécules du CMH, lesdits lymphocytes T cytotoxiques étant avantageusement prélevés sur un patient atteint d'une pathologie dans laquelle est impliqué le peptide parent de l'analogue peptidique étudié,

- et d'induire *in vitro* la sécrétion de cytokines (ou interleukines) par les lymphocytes T cytotoxiques susmentionnés, notamment IL-2, IL-4 ou l'interféron γ ,

lesdits analogues peptidiques ainsi sélectionnés étant :

- . soit des agonistes des récepteurs (TCR) reconnaissant l'antigène (à savoir le peptide parent) des cellules T cytotoxiques, et dérivent de peptides parents se comportant eux-mêmes comme des agonistes ou des antagonistes desdits récepteurs,

- . soit des agonistes partiels desdits récepteurs, et dérivent de peptides parents se comportant eux-mêmes comme des agonistes desdits récepteurs, ces agonistes partiels induisant notamment la sécrétion d'une ou plusieurs cytokines différentes de celles dont la sécrétion est induite par les peptides parents.

9. Analogues peptidiques selon l'une des revendications 2 à 7, caractérisés en ce qu'ils sont sélectionnés parmi ceux :

- susceptibles d'induire *in vitro* l'apparition et la croissance de lymphocytes T cytotoxiques à partir de cellules humaines ou animales, notamment à partir de cellules mononucléées issues du sang périphérique (PBMC), en présence de facteurs nécessaires à la croissance et la différenciation des cellules T cytotoxiques,

- n'induisant pas *in vitro* la cytolyse par des lymphocytes T cytotoxiques, de cellules cibles présentant à leur surface l'analogue peptidique associé aux molécules du CMH, lesdits lymphocytes T cytotoxiques étant avantageusement prélevés sur un patient atteint d'une pathologie dans laquelle est impliqué le peptide parent de l'analogue peptidique étudié,

- n'induisant pas *in vitro* la sécrétion de cytokines (ou interleukines) par les lymphocytes T cytotoxiques susmentionnés, notamment IL-2, IL-4 ou l'interféron γ ,

- lesdits analogues peptidiques ainsi sélectionnés étant des antagonistes des récepteurs des cellules T cytotoxiques.

10. Utilisation d'analogues peptidiques tels que définis dans l'une des revendications 2 à 9, pour la préparation de médicaments, notamment de vaccins,

destinés à la prévention ou au traitement des pathologies dans lesquelles les peptides parents sont des agonistes ou antagonistes des récepteurs reconnaissant l'antigène des cellules T cytotoxiques, et plus particulièrement des pathologies neurodégénératives infectieuses (d'origine virale ou bactérienne), tumorales
5 (notamment le mélanome), auto-immunes et allergiques.

11. Composition pharmaceutique, caractérisée en ce qu'elle comprend à titre de principe actif au moins un analogue peptidique tel que défini dans l'une des
10 revendications 1 à 10, en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

12. Composition pharmaceutique selon la revendication 11, caractérisée en
15 ce qu'elle se présente sous une forme administrable par voie orale, ou parentérale, notamment à raison d'environ 500 μ g à 5 mg par prise, notamment à raison de 3 prises par jour.

13. Vaccin caractérisé en ce qu'il comprend un analogue peptidique
20 agoniste, le cas échéant partiel, tel que défini dans l'une des revendications 1 à 8, en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

14. Composition de diagnostic pour le diagnostic *in vivo* des pathologies
25 définies dans la revendication 10, ou pour l'évaluation *in vivo* de la réponse immunitaire dans le cadre des pathologies susmentionnées, par mise en oeuvre d'une réaction cutanée d'hypersensibilité par injection intradermique de ladite composition de diagnostic, caractérisée en ce qu'elle comprend un analogue
30 peptidique tel que défini dans l'une des revendications 1 à 9, en association avec un véhicule physiologiquement acceptable.

15. Complexe entre un analogue peptidique tel défini dans l'une des
35 revendications 1 à 14, et un élément du complexe d'histocompatibilité majeur (encore désigné complexe binaire MHC-analogue peptidique), et éventuellement un récepteur de cellules T (encore désigné complexe ternaire MHC-analogue peptidique-récepteur T).

16. Méthode de diagnostic *in vitro* de pathologies associées à la présence dans l'organisme d'un patient, de peptides exogènes ou endogènes pouvant interagir avec des molécules du CMH, et susceptibles d'être directement ou indirectement impliqués dans le processus de développement de ces pathologies chez l'homme ou l'animal, caractérisée en ce qu'elle comprend:

- la mise en contact d'un échantillon biologique provenant d'un patient, avec un analogue peptidique tel défini dans l'une des revendications 1 à 9, dans des conditions permettant la réaction entre les récepteurs des cellules T susceptibles d'être présentes dans l'échantillon biologique, et le complexe binaire susceptible d'être formé entre ledit analogue peptidique et les molécules du CMH présentes dans ledit échantillon ;

- la détection *in vitro* du complexe ternaire CMH-analogue peptidique peptidique-récepteur T, susceptible d'être formé à l'étape précédente.

17. Nécessaire ou kit pour la mise en oeuvre de méthodes de diagnostic *in vitro* selon la revendication 16, comprenant:

- un analogue peptidique tel défini dans l'une des revendications 1 à 9;
- des réactifs pour rendre un milieu apte à la formation d'une réaction immunologique;

- des réactifs permettant de détecter le complexe ternaire selon la revendication 15 ou 16, qui a été produit à l'issue de la réaction immunologique, lesdits réactifs contenant éventuellement un marqueur ou étant susceptibles d'être reconnus à leur tour par un réactif marqué, plus particulièrement dans le cas où ledit analogue peptidique n'est pas marqué.

18. Anticorps dirigés contre les complexes binaires tels que définis dans la revendication 15, lesdits anticorps étant tels qu'obtenus par immunisation d'un animal avec au moins un complexe binaire susmentionné, lesdits anticorps étant susceptibles de former un complexe avec ces complexes binaires.

19. Composition pharmaceutique, caractérisée en ce qu'elle comprend des anticorps selon la revendication 18, en association avec un véhicule physiologiquement acceptable.

20. Procédé de criblage d'analogues peptidiques tels que définis dans l'une des revendications 1 à 9, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- 5 • incubation pendant des temps variables de quelques minutes à plusieurs jours, de l'analogue peptidique en présence de molécules du CMH, provenant de la lyse de cellules humaines ou animales, ou purifiées notamment par chromatographie d'affinité à partir de lignées cellulaires humaines ou animales, sur un support solide recouvert d'un premier anticorps, notamment monoclonal, reconnaissant spécifiquement les molécules du CMH dans leur conformation dépendante de leur liaison audit analogue peptidique,
- 10 • addition sur le support solide précédent d'un deuxième anticorps marqué, notamment par couplage à un marqueur radioactif, enzymatique ou fluorescent, ledit anticorps marqué reconnaissant spécifiquement soit les molécules du CMH dans leur conformation dépendante de leur liaison à l'analogue peptidique, soit une molécule se liant elle-même spécifiquement aux molécules du
- 15 CMH dans leur conformation susmentionnée, notamment la β 2-microglobuline reconnaissant spécifiquement les molécules du CMH de classe I,
- détection, après rinçage du support solide, de l'éventuelle présence du deuxième anticorps marqué resté fixé sur le support solide,
- évaluation de la durée de l'association entre ledit analogue peptidique
- 20 et les molécules du CMH.

21. Trousse ou kit pour la mise en oeuvre d'un procédé de criblage selon la revendication 20, comprenant :

- 25 - des molécules du CMH, et/ou
- des anticorps, reconnaissant spécifiquement les molécules du CMH dans leur conformation dépendante de leur liaison audit analogue peptidique, avantageusement fixés sur un support solide, ou fournis avec les réactifs nécessaires à leur fixation sur le support solide, et/ou
- 30 - des anticorps marqués, notamment par couplage à un marqueur radioactif, enzymatique ou fluorescent, reconnaissant spécifiquement soit les molécules du CMH dans leur conformation dépendante de leur liaison à l'analogue peptidique, soit une molécule se liant elle-même spécifiquement aux molécules du CMH dans leur conformation susmentionnée, notamment la β 2-microglobuline reconnaissant spécifiquement les molécules du CMH de classe I, et/ou
- 35 - un protocole pour la mise en oeuvre dudit procédé, et/ou
- un peptide de contrôle.

REVENDECATIONS

1. Utilisation d'analogues peptidiques de peptides parents, ces peptides parents étant le cas échéant issus de protéines exogènes ou endogènes, lesdits peptides parents pouvant interagir avec des molécules du CMH dans le cadre de pathologies chez l'homme ou l'animal, lesdits analogues étant caractérisés en ce qu'ils correspondent auxdits peptides parents dans lesquels :

- au moins une liaison peptidique -CO-NH- de la chaîne peptidique, est modifiée, à l'exception des modifications du type rétro, ou rétro-inverso, ou

- au moins un acide aminé de la chaîne peptidique, est substitué par un acide aminé non protéinogénique, ou

- au moins une liaison peptidique -CO-NH- de la chaîne peptidique, est modifiée, et au moins un acide aminé de ladite chaîne peptidique est substitué par un acide non protéinogénique,

pour :

- la préparation d'un médicament destiné à la prévention ou au traitement des pathologies susmentionnées, ou

- la préparation d'une composition destinée au diagnostic *in vivo* des pathologies susmentionnées, ou à l'évaluation *in vivo* de la réponse immunitaire dans le cadre des pathologies susmentionnées, par mise en oeuvre d'une réaction cutanée d'hypersensibilité par injection intradermique de ladite composition, ou

- la mise en oeuvre d'une méthode de diagnostic *in vitro* desdites pathologies.

2. Analogues peptidiques de peptides parents, ces peptides parents étant le cas échéant issus de protéines exogènes ou endogènes, lesdits peptides parents pouvant interagir avec des molécules du CMH dans le cadre de pathologies chez l'homme ou l'animal, lesdits analogues étant caractérisés en ce qu'ils correspondent auxdits peptides parents dans lesquels :

- au moins une liaison peptidique -CO-NH- de la chaîne peptidique est modifiée, à l'exception des modifications du type rétro, ou rétro-inverso, ou

- au moins un acide aminé de la chaîne peptidique, est substitué par un acide aminé non protéinogénique, ou

- au moins une liaison amide -CO-NH- de la chaîne peptidique, est modifiée, et au moins un acide aminé de la chaîne peptidique, est substitué par un acide non protéinogénique.

3. Analogues peptidiques selon la revendication 2, caractérisés en ce que le nombre de résidus aminoacyles protéinogéniques ou non, et reliés par une liaison

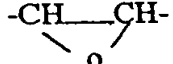
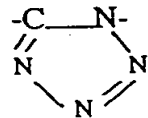
modifiée ou non, est compris entre environ 5 et environ 20, de préférence entre 8 et 12 pour les analogues peptidiques se liant aux molécules du CMH de classe I, et de préférence entre 8 et 16 pour les analogues peptidiques se liant aux molécules du CMH de classe II.

5

4. Analogues peptidiques selon la revendication 2 ou la revendication 3, caractérisés en ce que l'une au moins des liaisons peptidiques -CO-NH- de la chaîne peptidique du peptide parent est remplacée par une liaison différente de la liaison -CO-NH- , ladite liaison différente étant notamment choisie parmi les

10

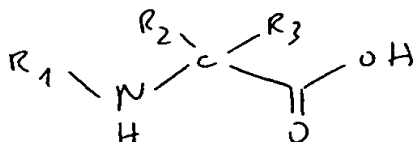
suivantes :

- $\text{-CH}_2\text{-NH-}$ (méthylène amino) ;
- $\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$ (carba) ;
- $\text{-CO-CH}_2\text{-}$ (cétométhylène) ;
- $\text{-CH}_2\text{-O-}$ (méthylène-oxy) ;
- 15 $\text{-CHOH-CH}_2\text{-}$ (hydroxyéthylène) ;
- -CHOH-CHOH- (di-hydroxyéthylène) ;
- -CH=CH- (E ou Z oléfine) ;
- -CHCN-NH- (cyanométhylène amino) ;
- $\text{-S-CH}_2\text{-}$ (thiométhylène) ;
- 20 $\text{-CH}_2\text{-S-}$ (méthylène thio) ;
- -CS-NH- (thioamide) ;
- $\text{-PO}_2\text{-NH-}$ (phosphonamide) ;
- -CHOH- (hydroxyméthylène) ;
- -NH-CO-NH- (urée) ;
- 25 -CH-CH- (oxirane) ;

- -C-N- (tétrazole) ;

- 30 $\text{-CH}_2\text{-CO-NH-}$ (β -homologation) ;
- $\text{-CHOH-CH}_2\text{-NH-}$ (hydroxyéthylène amino) ;
- -CO-NH-NH- (hydrazino).

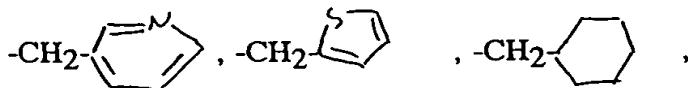
35

5. Analogues peptidiques selon la revendication 4, caractérisés en ce que l'une au moins des liaisons amides -CO-NH- de la chaîne peptidique ou peptide parent est remplacée par une liaison méthylène amino, ou du type β -homologation, ou carba, ou cétométhylène, ou cyanométhylène amino, ou hydroxyéthylène amino.

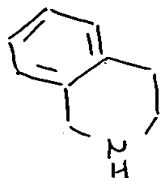
- les acides aminés de configuration D,
- les acides α -aminés de formule générale :



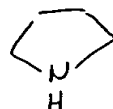
- R₁, R₂ et R₃, représentent indépendamment les uns des autres : un atome d'hydrogène, un hydroxyle, un radical alkyle de 1 à 25 atomes de carbone, un radical contenant un groupe allyle et ayant de 3 à 25 atomes de carbone, un radical contenant un ou plusieurs cycles aromatiques ou non, notamment un groupe aryle, et ayant de 6 à 25 atomes de carbone, et notamment les groupes suivants : -CH₃ (méthyl), -CH₂CH₃ (éthyl), -(CH₂)₄-CH₃, -CH(CH₃)₂ (isopropyl), -C(CH₃)₃ (tertibutyl), -Φ (phényl), -CH₂Φ (benzyl), -CH₂ΦCl (para-chlorobenzyl), -CH₂-CH₂Φ (2-phényl-éthyl), -CH₂CHCH₂ (alkyl), méthylfluorényl, -CH₂CONH₂ (glycolamide), -CH₂CONΦ₂ (benzhydrylglycolamide), -CHOHΦ,



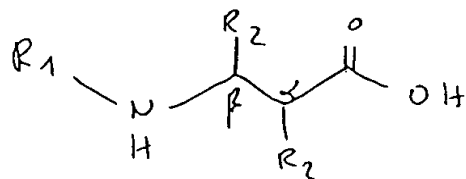
- le cas échéant, R₁, R₂, Cα et N forment un hétérocycle de 4 à 8 atomes de carbone, aromatique ou non, le cas échéant substitué, notamment un hétérocycle de formule :



ou



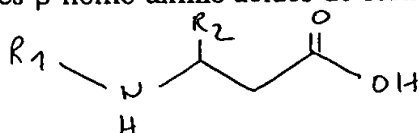
- les acides β -aminés de formule générale :



dans laquelle R_1 , R_2 et R_3 , indépendamment les uns des autres représentent une chaîne latérale d'un acide aminé naturel, ou sont tels que définis ci-dessus,

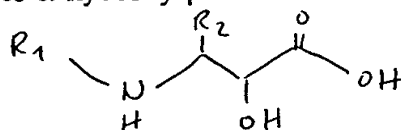
notamment :

. les β -homo amino acides de formule :



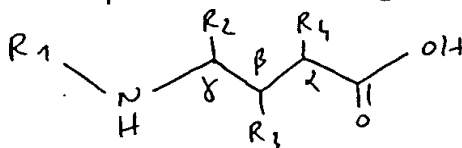
dans laquelle R_1 et R_2 , sont tels que définis ci-dessus, ou

. les α -hydroxy β -homo amino acides de formule :



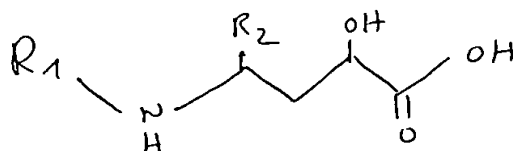
dans laquelle R_1 et R_2 , sont tels que définis ci-dessus,

- les acides γ -aminés de formule générale :



dans laquelle R_1 , R_2 , R_3 et R_4 représentent indépendamment les uns des autres une chaîne latérale d'un acide aminé naturel, ou R_1 , R_2 et R_3 , sont tels que définis ci-dessus, et R_4 a la même signification que celle donnée ci-dessus pour R_1 , R_2 et R_3 ,

notamment les dérivés de statine de formule :



7. Analogues peptidiques selon l'une des revendications 2 à 6, caractérisés en ce qu'ils sont sélectionnés parmi ceux susceptibles :

- d'une part d'être reconnus par les molécules du CMH et de s'associer avec ces dernières, notamment par mise en oeuvre de la méthode suivante :

5 • incubation, de l'analogue peptidique en présence de molécules du CMH, provenant de la lyse de cellules humaines ou animales, ou purifiées notamment par chromatographie d'affinité à partir de lignées cellulaires humaines ou animales, sur un support solide recouvert d'un premier anticorps, notamment monoclonal, reconnaissant spécifiquement les molécules du CMH dans leur
10 conformation dépendante de leur liaison audit analogue peptidique,

 • addition sur le support solide précédent d'un deuxième anticorps marqué, notamment par couplage à un marqueur radioactif, enzymatique ou fluorescent, ledit anticorps marqué reconnaissant spécifiquement soit les molécules
15 du CMH dans leur conformation dépendante de leur liaison à l'analogue peptidique, soit une molécule se liant elle-même spécifiquement aux molécules du CMH dans leur conformation susmentionnée, notamment la β 2-microglobuline reconnaissant spécifiquement les molécules du CMH de classe I,

 • détection, après rinçage du support solide, de l'éventuelle présence du deuxième anticorps marqué resté fixé sur le support solide, témoignant d'un effet
20 de reconnaissance et d'association entre les molécules du CMH et l'analogue peptidique étudié,

- et, d'autre part, de former un complexe avec lesdites molécules du CMH, dont la stabilité peut être évaluée par mise en oeuvre d'une méthode de suivi dans le temps de la liaison établie entre l'analogue peptidique et les
25 molécules du CMH, cette méthode étant avantageusement effectuée selon un protocole identique à la méthode précédente, mais dans laquelle l'étape d'incubation de l'analogue peptidique en présence des molécules du CMH sur le support solide recouvert dudit premier anticorps, se fait pendant des temps variables de quelques minutes à plusieurs jours.

30

8. Analogues peptidiques selon l'une des revendications 2 à 7, caractérisés en ce qu'ils sont sélectionnés parmi ceux susceptibles :

- d'induire *in vitro* l'apparition et la croissance de lymphocytes T cytotoxiques à partir de cellules humaines ou animales, notamment à partir de
35 cellules mononucléées issues du sang périphérique (PBMC), en présence de facteurs nécessaires à la croissance et la différenciation des cellules T cytotoxiques,

- d'induire *in vitro* la cytolyse par des lymphocytes T cytotoxiques, de cellules cibles présentant à leur surface l'analogue peptidique associé aux

molécules du CMH, lesdits lymphocytes T cytotoxiques étant avantageusement prélevés sur un patient atteint d'une pathologie dans laquelle est impliqué le peptide parent de l'analogue peptidique étudié,

- et d'induire *in vitro* la sécrétion de cytokines (ou interleukines) par les lymphocytes T cytotoxiques susmentionnés, notamment IL-2, IL-4 ou l'interféron γ ,

lesdits analogues peptidiques ainsi sélectionnés étant :

- . soit des agonistes des récepteurs (TCR) reconnaissant l'antigène (à savoir le peptide parent) des cellules T cytotoxiques, et dérivent de peptides parents se comportant eux-mêmes comme des agonistes ou des antagonistes desdits récepteurs,

- . soit des agonistes partiels desdits récepteurs, et dérivent de peptides parents se comportant eux-mêmes comme des agonistes desdits récepteurs, ces agonistes partiels induisant notamment la sécrétion d'une ou plusieurs cytokines différentes de celles dont la sécrétion est induite par les peptides parents.

9. Analogues peptidiques selon l'une des revendications 2 à 7, caractérisés en ce qu'ils sont sélectionnés parmi ceux :

- susceptibles d'induire *in vitro* l'apparition et la croissance de lymphocytes T cytotoxiques à partir de cellules humaines ou animales, notamment à partir de cellules mononucléées issues du sang périphérique (PBMC), en présence de facteurs nécessaires à la croissance et la différenciation des cellules T cytotoxiques,

- n'induisant pas *in vitro* la cytolyse par des lymphocytes T cytotoxiques, de cellules cibles présentant à leur surface l'analogue peptidique associé aux molécules du CMH, lesdits lymphocytes T cytotoxiques étant avantageusement prélevés sur un patient atteint d'une pathologie dans laquelle est impliqué le peptide parent de l'analogue peptidique étudié,

- n'induisant pas *in vitro* la sécrétion de cytokines (ou interleukines) par les lymphocytes T cytotoxiques susmentionnés, notamment IL-2, IL-4 ou l'interféron γ ,

lesdits analogues peptidiques ainsi sélectionnés étant des antagonistes des récepteurs des cellules T cytotoxiques.

10. Utilisation d'analogues peptidiques définis dans l'une des revendications 1 à 9, pour la préparation de médicaments, notamment de vaccins, destinés à la

prévention ou au traitement des pathologies dans lesquelles les peptides parents sont des agonistes ou antagonistes des récepteurs reconnaissant l'antigène des cellules T cytotoxiques, et plus particulièrement des pathologies neurodégénératives infectieuses (d'origine virale ou bactérienne), tumorales (notamment le mélanome), auto-immunes et allergiques.

11. Composition pharmaceutique, caractérisée en ce qu'elle comprend à titre de principe actif au moins un analogue peptidique défini dans l'une des revendication 1 à 9, en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

12. Composition pharmaceutique selon la revendication 11, caractérisée en ce qu'elle se présente sous une forme administrable par voie orale, ou parentérale, notamment à raison d'environ 500 μ g à 5 mg par prise, notamment à raison de 3 prises par jour.

13. Vaccin caractérisé en ce qu'il comprend un analogue peptidique agoniste, le cas échéant partiel, défini dans l'une des revendications 1 à 8, en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

14. Composition de diagnostic pour le diagnostic *in vivo* des pathologies définies dans la revendication 10, ou pour l'évaluation *in vivo* de la réponse immunitaire dans le cadre des pathologies susmentionnées, par mise en oeuvre d'une réaction cutanée d'hypersensibilité par injection intradermique de ladite composition de diagnostic, caractérisée en ce qu'elle comprend un analogue peptidique défini dans l'une des revendications 1 à 9, en association avec un véhicule physiologiquement acceptable.

15. Complexe entre un analogue peptidique défini dans l'une des revendications 1 à 9, et un élément du complexe d'histocompatibilité majeur (encore désigné complexe binaire MHC-analogue peptidique), et éventuellement un récepteur de cellules T (encore désigné complexe ternaire MHC-analogue peptidique-récepteur T).

16. Méthode de diagnostic *in vitro* de pathologies associées à la présence dans l'organisme d'un patient, de peptides exogènes ou endogènes pouvant interagir avec des molécules du CMH, et susceptibles d'être directement ou indirectement impliqués dans le processus de développement de ces pathologies chez l'homme ou l'animal, caractérisée en ce qu'elle comprend:

- la mise en contact d'un échantillon biologique provenant d'un patient, avec un analogue peptidique défini dans l'une des revendications 1 à 9, dans des conditions permettant la réaction entre les récepteurs des cellules T susceptibles d'être présentes dans l'échantillon biologique, et le complexe binaire susceptible d'être formé entre ledit analogue peptidique et les molécules du CMH présentes dans ledit échantillon ;

- la détection *in vitro* du complexe ternaire CMH-analogue peptidique peptidique-récepteur T, susceptible d'être formé à l'étape précédente.

17. Nécessaire ou kit pour la mise en oeuvre de méthodes de diagnostic *in vitro* selon la revendication 16, comprenant:

- un analogue peptidique défini dans l'une des revendications 1 à 9;

- des réactifs pour rendre un milieu apte à la formation d'une réaction immunologique;

- des réactifs permettant de détecter le complexe ternaire selon la revendication 15, qui a été produit à l'issue de la réaction immunologique, lesdits réactifs contenant éventuellement un marqueur ou étant susceptibles d'être reconnus à leur tour par un réactif marqué, plus particulièrement dans le cas où ledit analogue peptidique n'est pas marqué.

18. Anticorps dirigés contre les complexes binaires tels que définis dans la revendication 15, lesdits anticorps étant tels qu'obtenus par immunisation d'un animal avec au moins un complexe binaire susmentionné, lesdits anticorps étant susceptibles de former un complexe avec ces complexes binaires.

19. Composition pharmaceutique, caractérisée en ce qu'elle comprend des anticorps selon la revendication 18, en association avec un véhicule physiologiquement acceptable.

20. Procédé de criblage d'analogues peptidiques définis dans l'une des revendications 1 à 9, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- incubation pendant des temps variables de quelques minutes à plusieurs jours, de l'analogue peptidique en présence de molécules du CMH, 5 provenant de la lyse de cellules humaines ou animales, ou purifiées notamment par chromatographie d'affinité à partir de lignées cellulaires humaines ou animales, sur un support solide recouvert d'un premier anticorps, notamment monoclonal, reconnaissant spécifiquement les molécules du CMH dans leur conformation dépendante de leur liaison audit analogue peptidique,
- 10 • addition sur le support solide précédent d'un deuxième anticorps marqué, notamment par couplage à un marqueur radioactif, enzymatique ou fluorescent, ledit anticorps marqué reconnaissant spécifiquement soit les molécules du CMH dans leur conformation dépendante de leur liaison à l'analogue peptidique, soit une molécule se liant elle-même spécifiquement aux molécules du 15 CMH dans leur conformation susmentionnée, notamment la β 2-microglobuline reconnaissant spécifiquement les molécules du CMH de classe I,
- détection, après rinçage du support solide, de l'éventuelle présence du deuxième anticorps marqué resté fixé sur le support solide,
- évaluation de la durée de l'association entre ledit analogue peptidique 20 et les molécules du CMH.

21. Trousse ou kit pour la mise en oeuvre d'un procédé de criblage selon la revendication 20, comprenant :

- des molécules du CMH, et/ou
- 25 - des anticorps, reconnaissant spécifiquement les molécules du CMH dans leur conformation dépendante de leur liaison audit analogue peptidique, avantageusement fixés sur un support solide, ou fournis avec les réactifs nécessaires à leur fixation sur le support solide, et/ou
- des anticorps marqués, notamment par couplage à un marqueur radioactif, 30 enzymatique ou fluorescent, reconnaissant spécifiquement soit les molécules du CMH dans leur conformation dépendante de leur liaison à l'analogue peptidique, soit une molécule se liant elle-même spécifiquement aux molécules du CMH dans leur conformation susmentionnée, notamment la β 2-microglobuline reconnaissant spécifiquement les molécules du CMH de classe I, et/ou
- 35 - un protocole pour la mise en oeuvre dudit procédé, et/ou
- un peptide de contrôle.

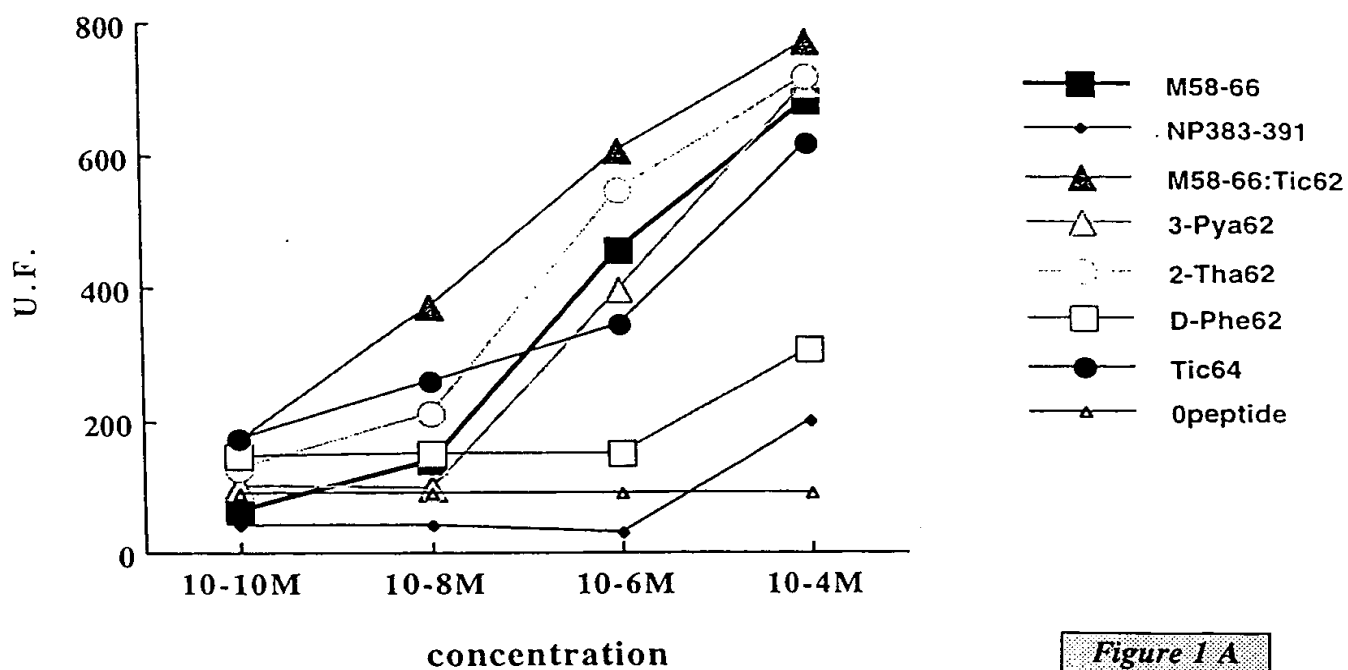


Figure 1 A

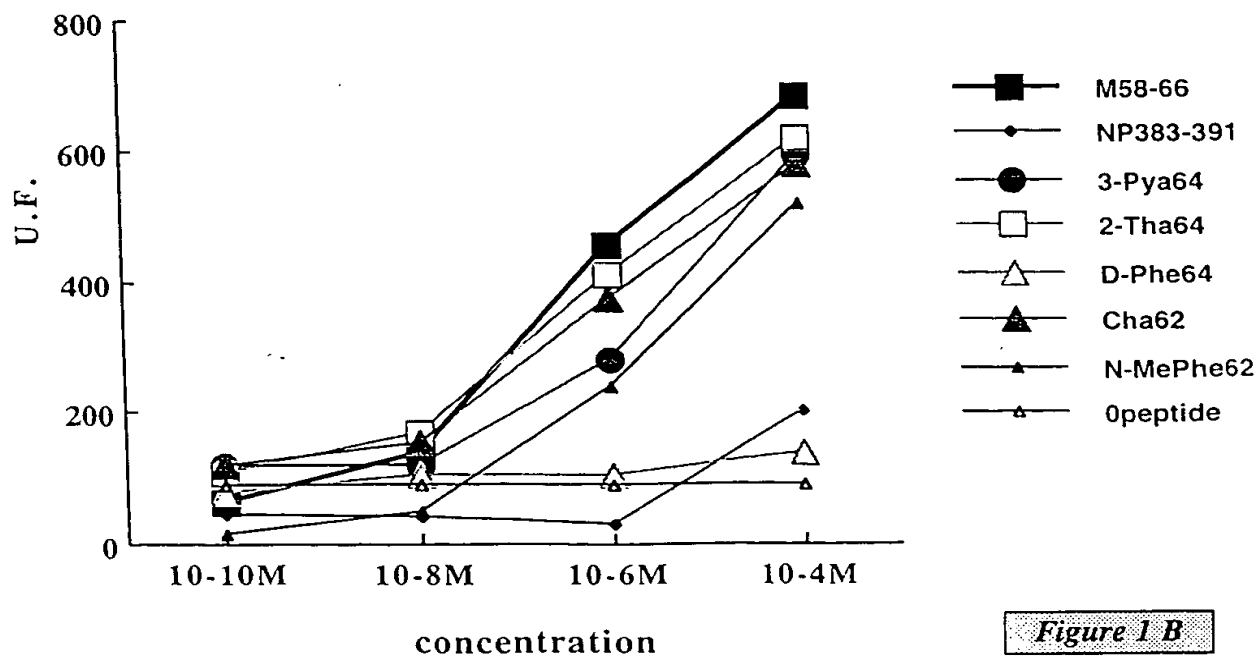


Figure 1 B

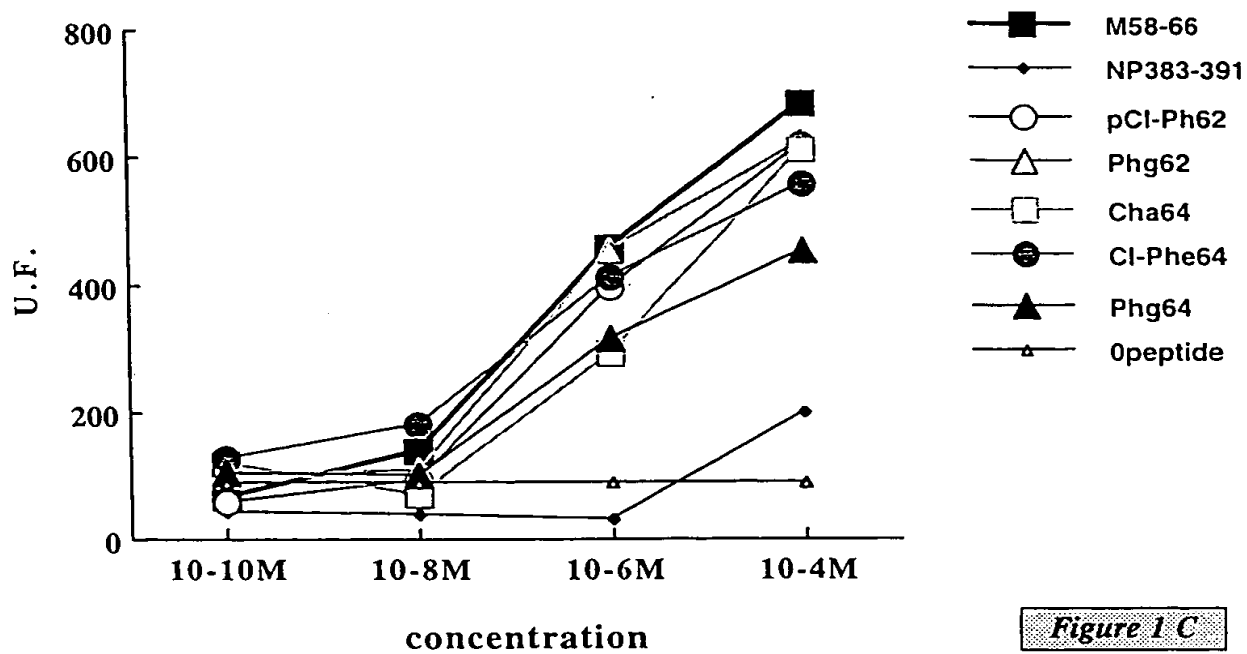


Figure 1 C

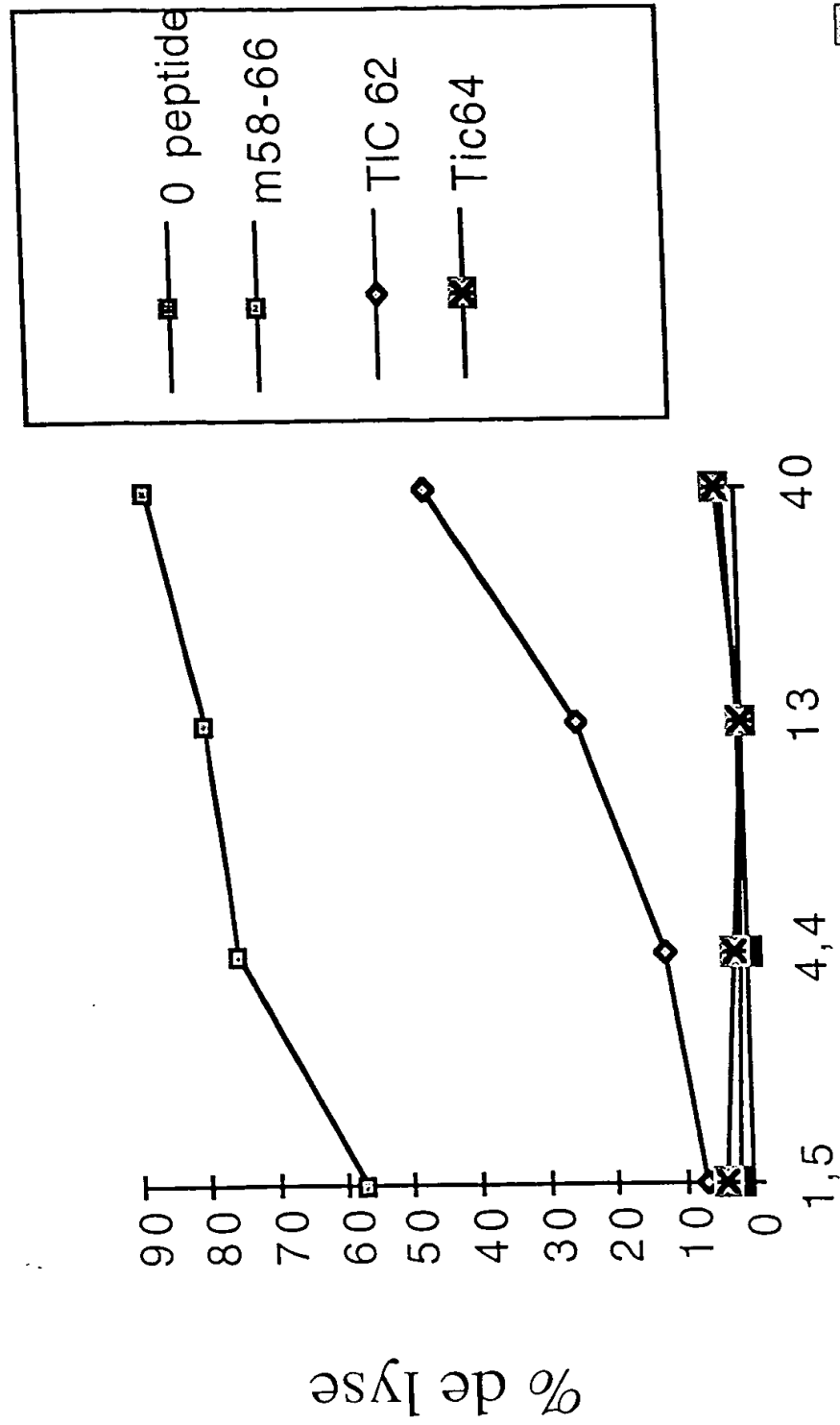


Figure 2 A

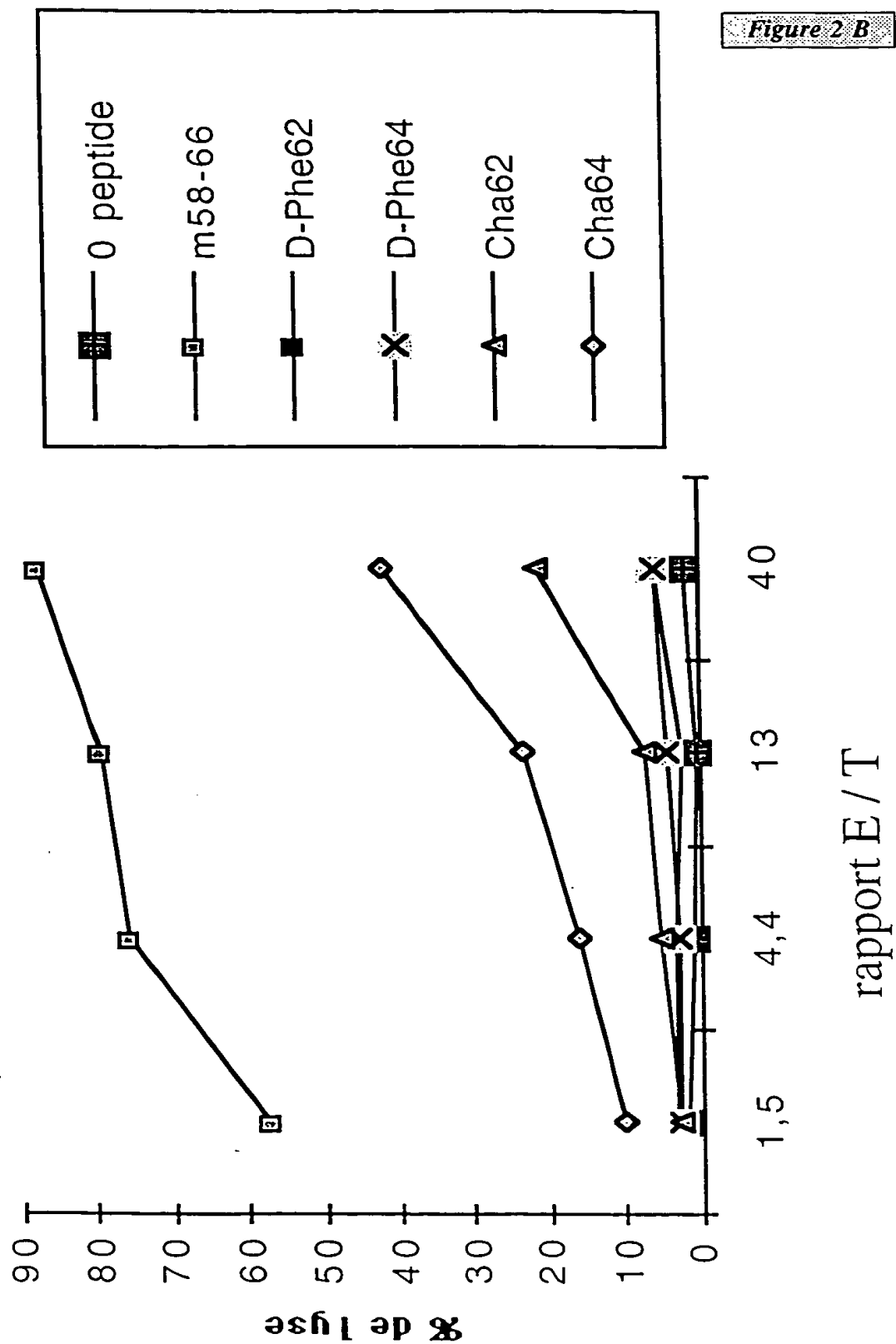
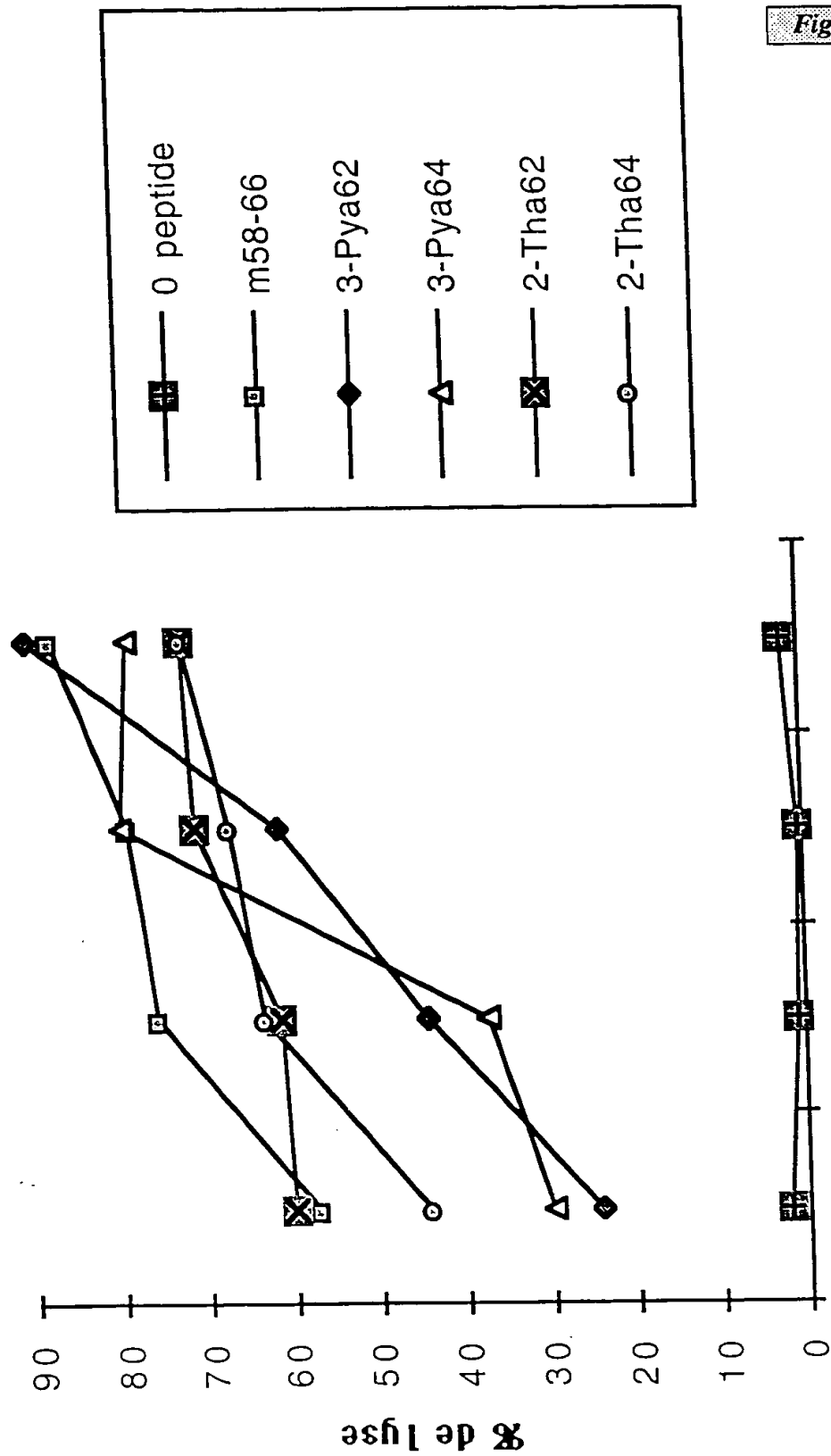


Figure 2 C



rapport E / T

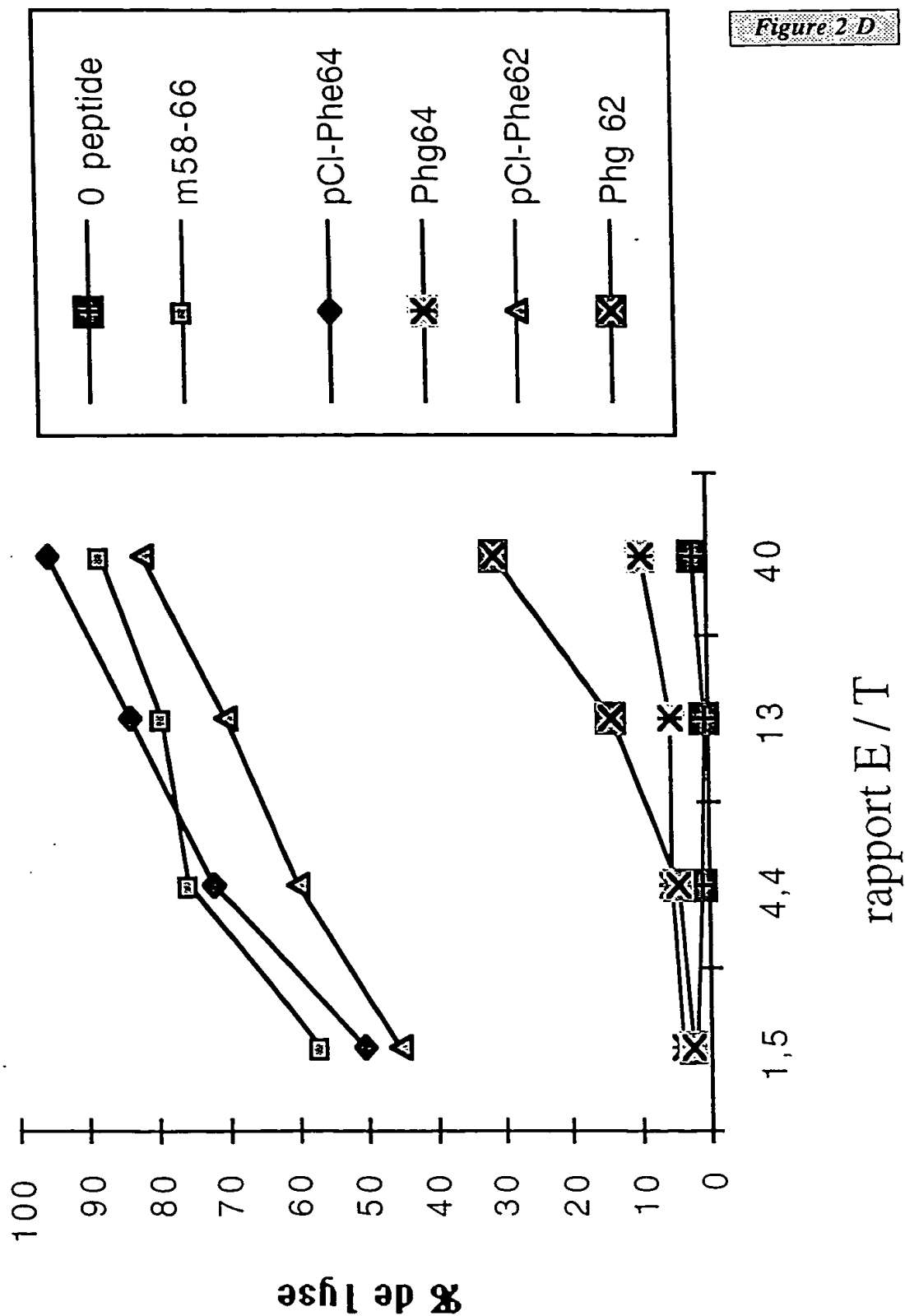


Figure 3 A

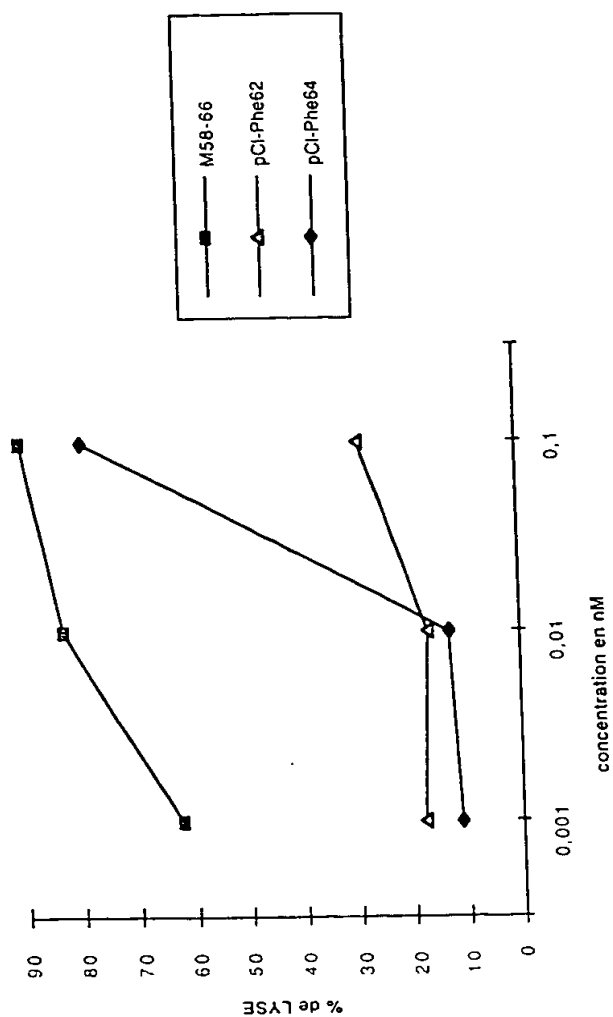


Figure 3 B

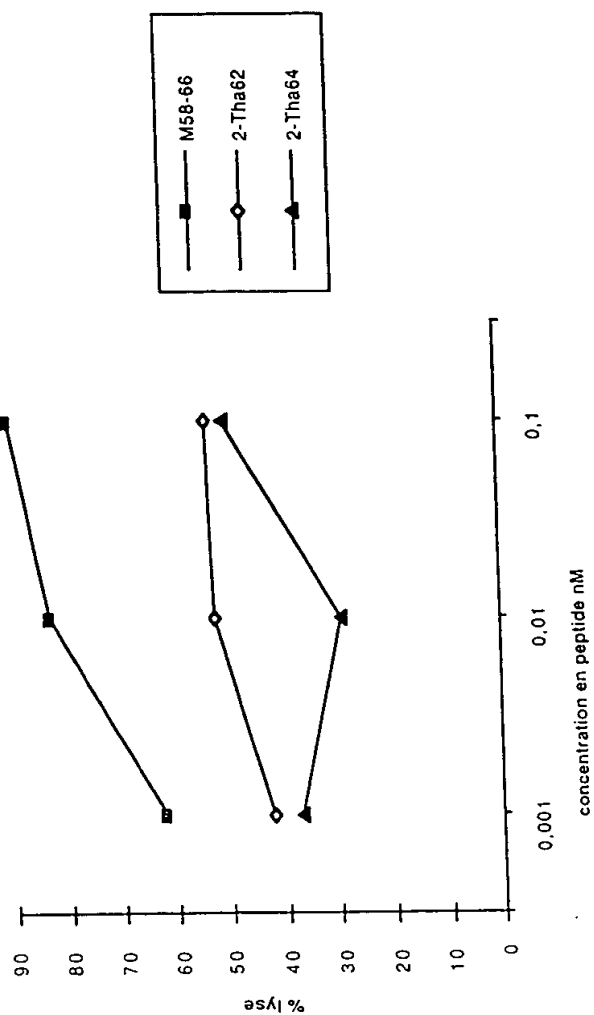


Figure 4 A

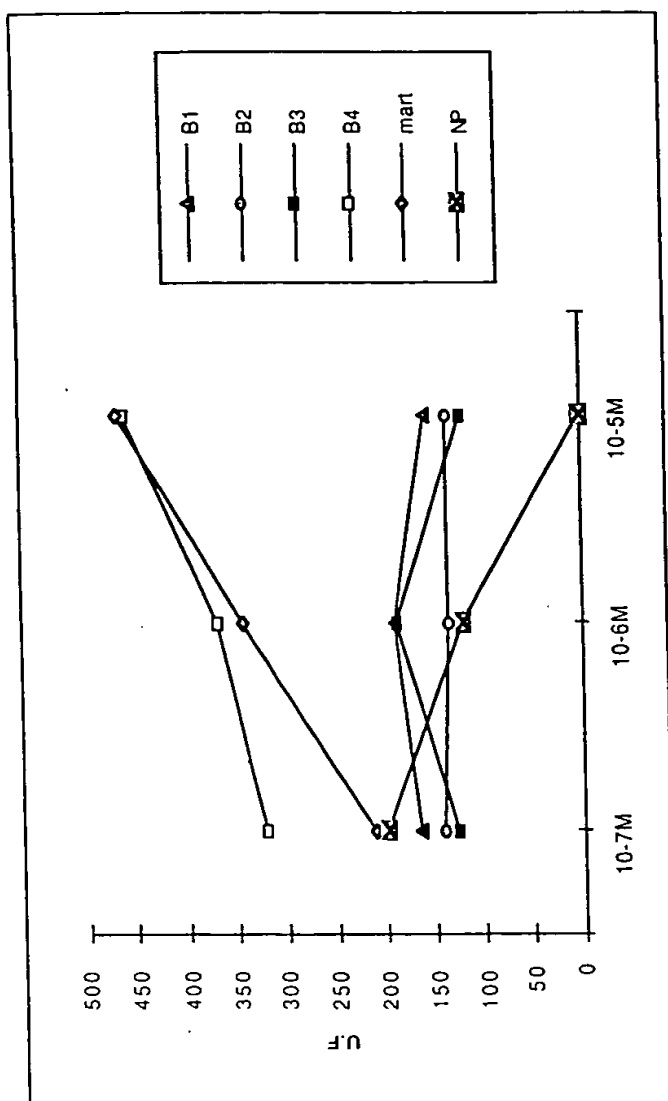


Figure 4 B

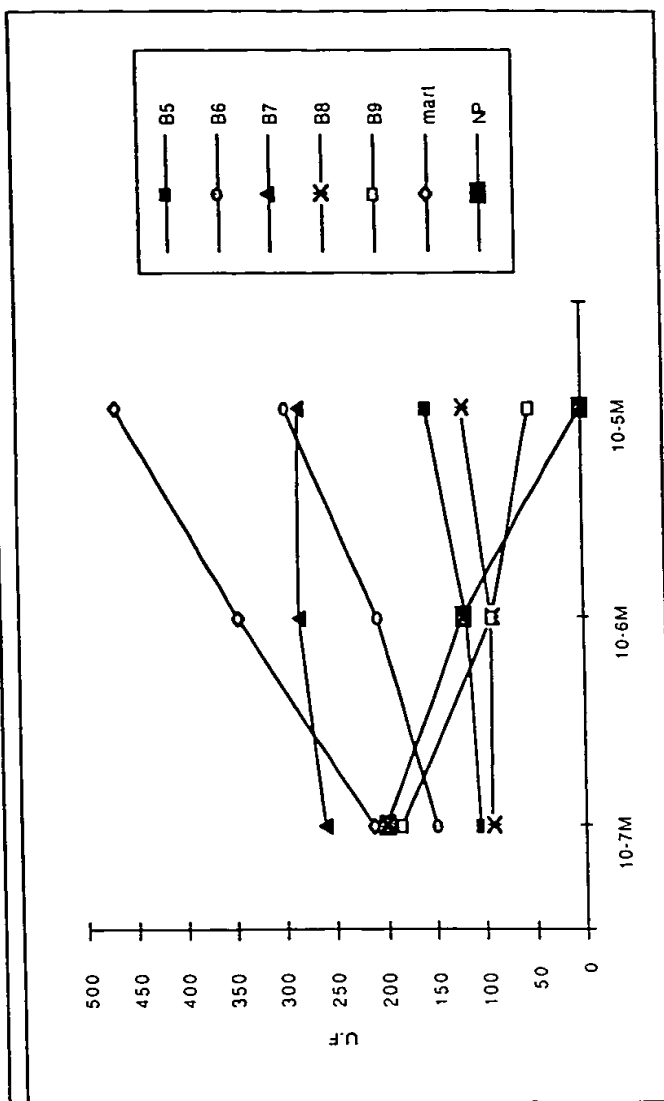


Figure 5

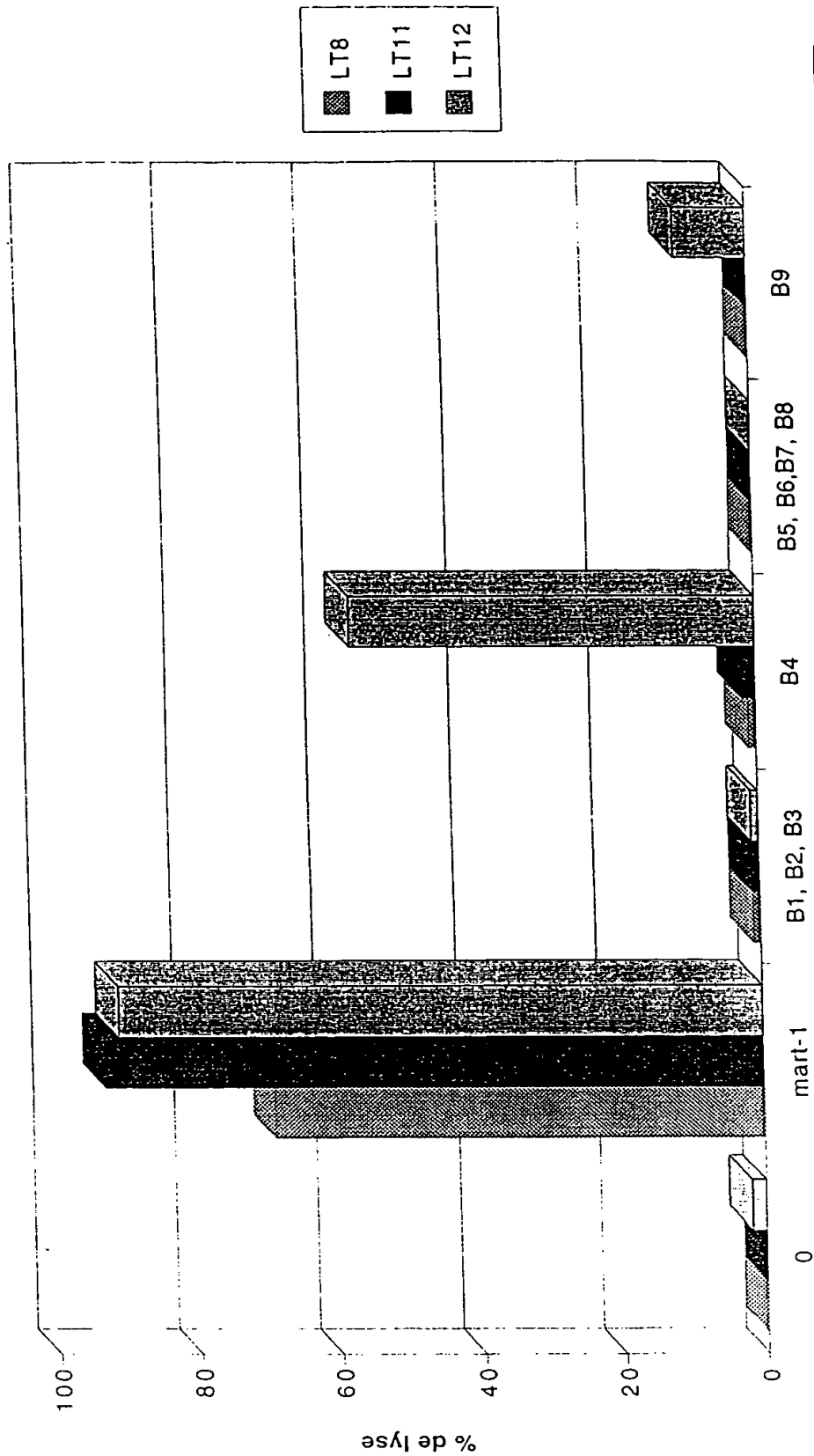


Figure 6

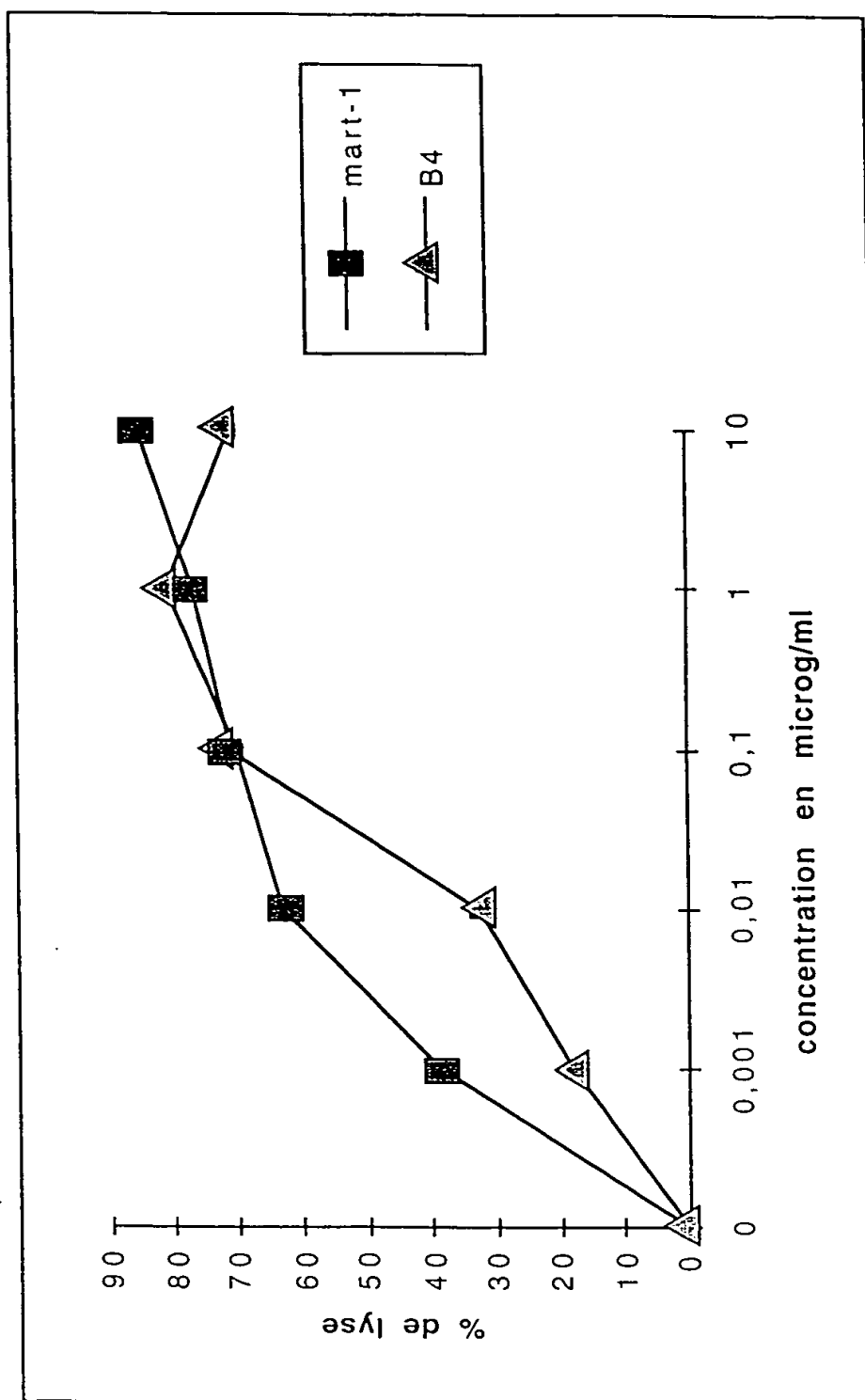


Figure 7 A

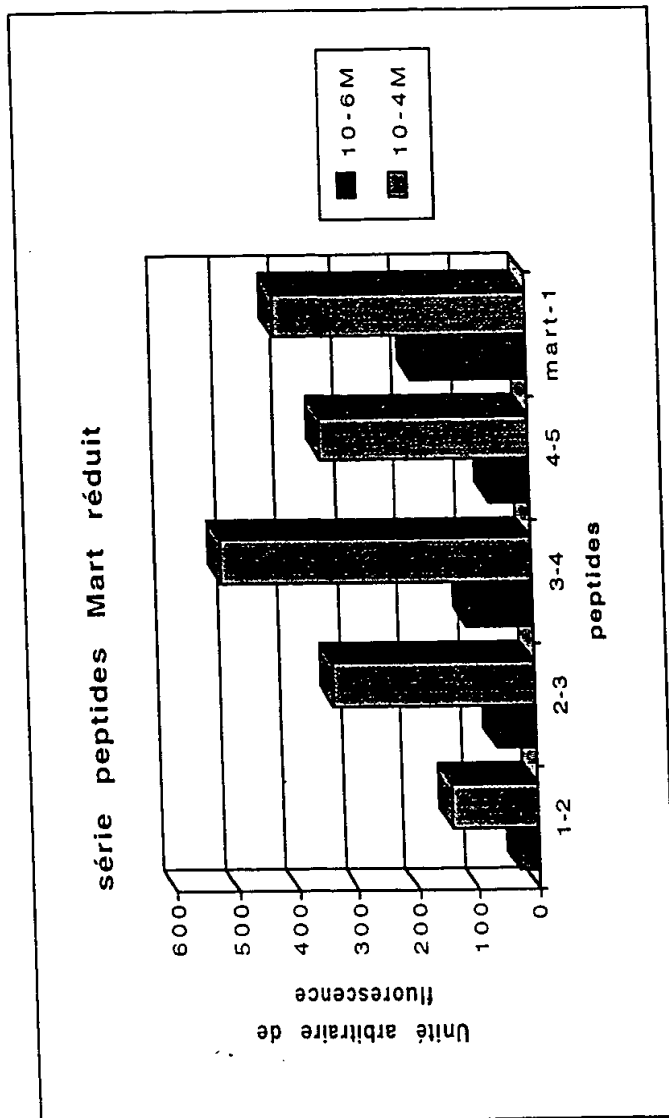


Figure 7 B

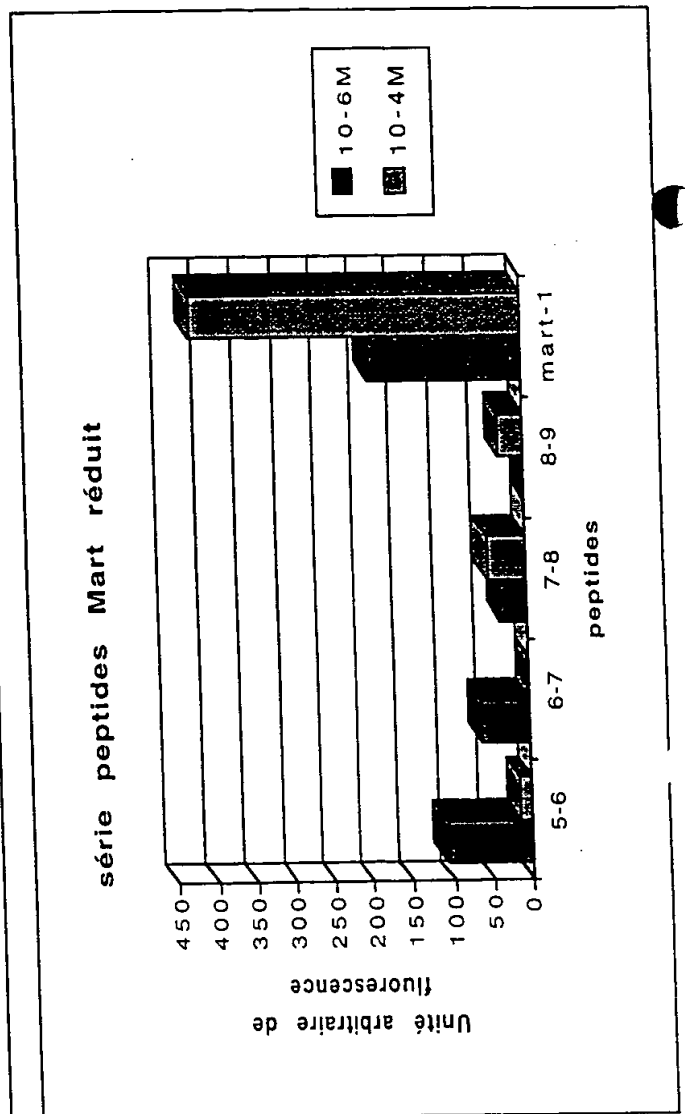
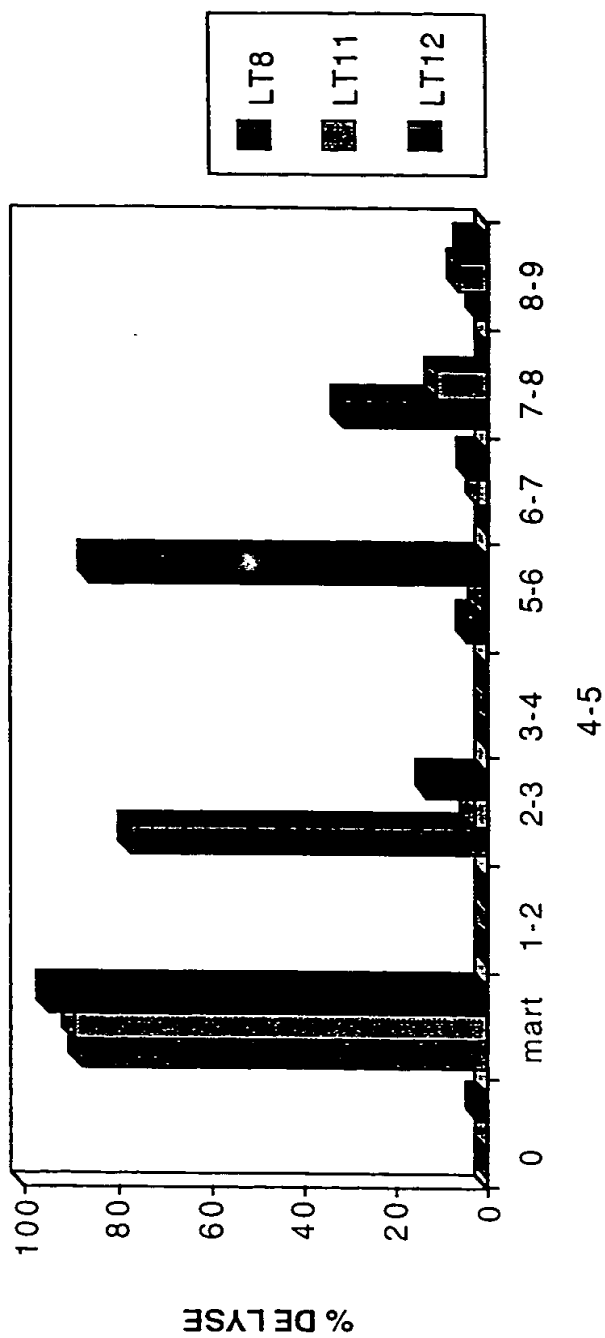


Figure 8



Peptides mart-1 réduits

Figure 9 A

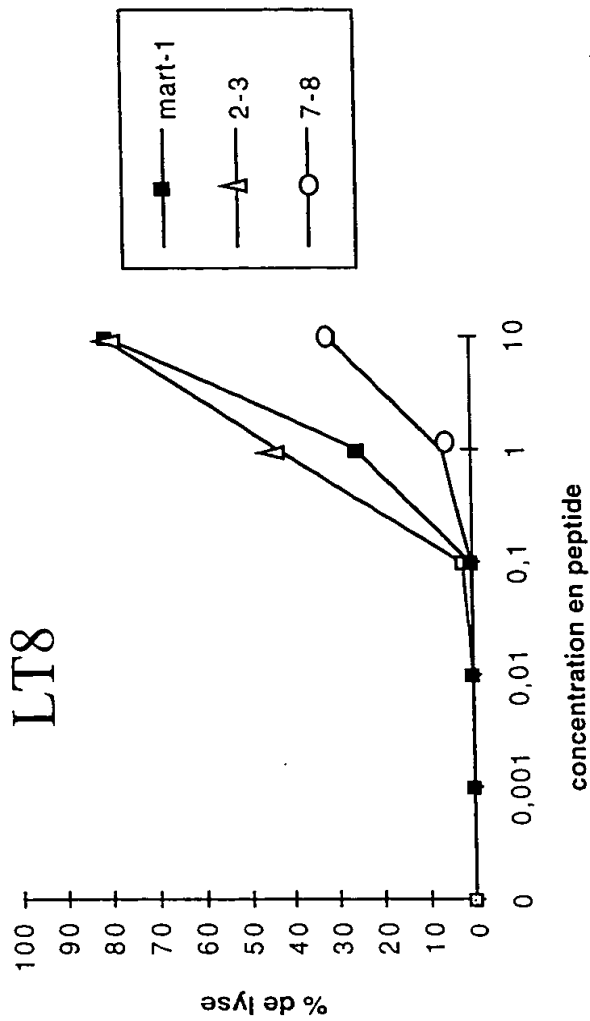
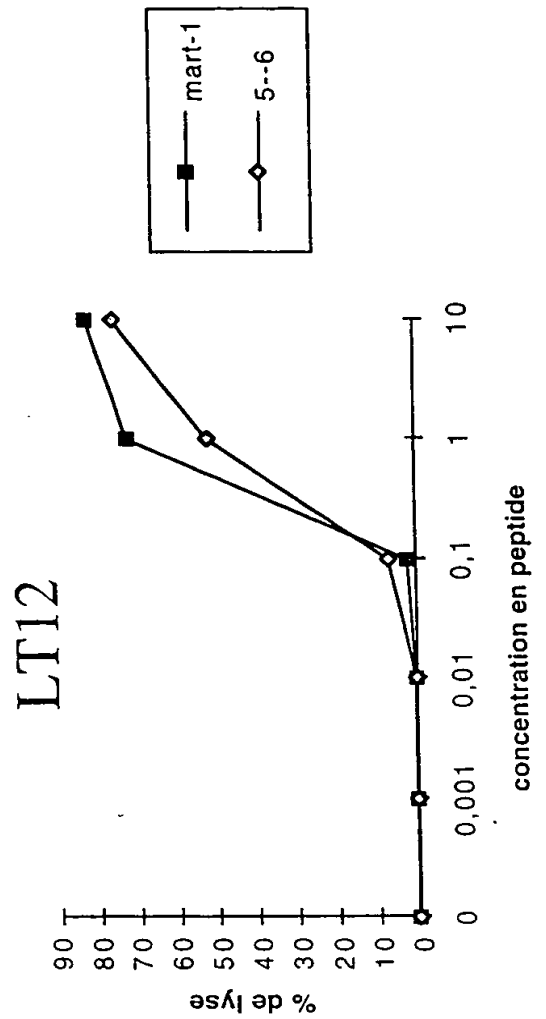


Figure 9 B



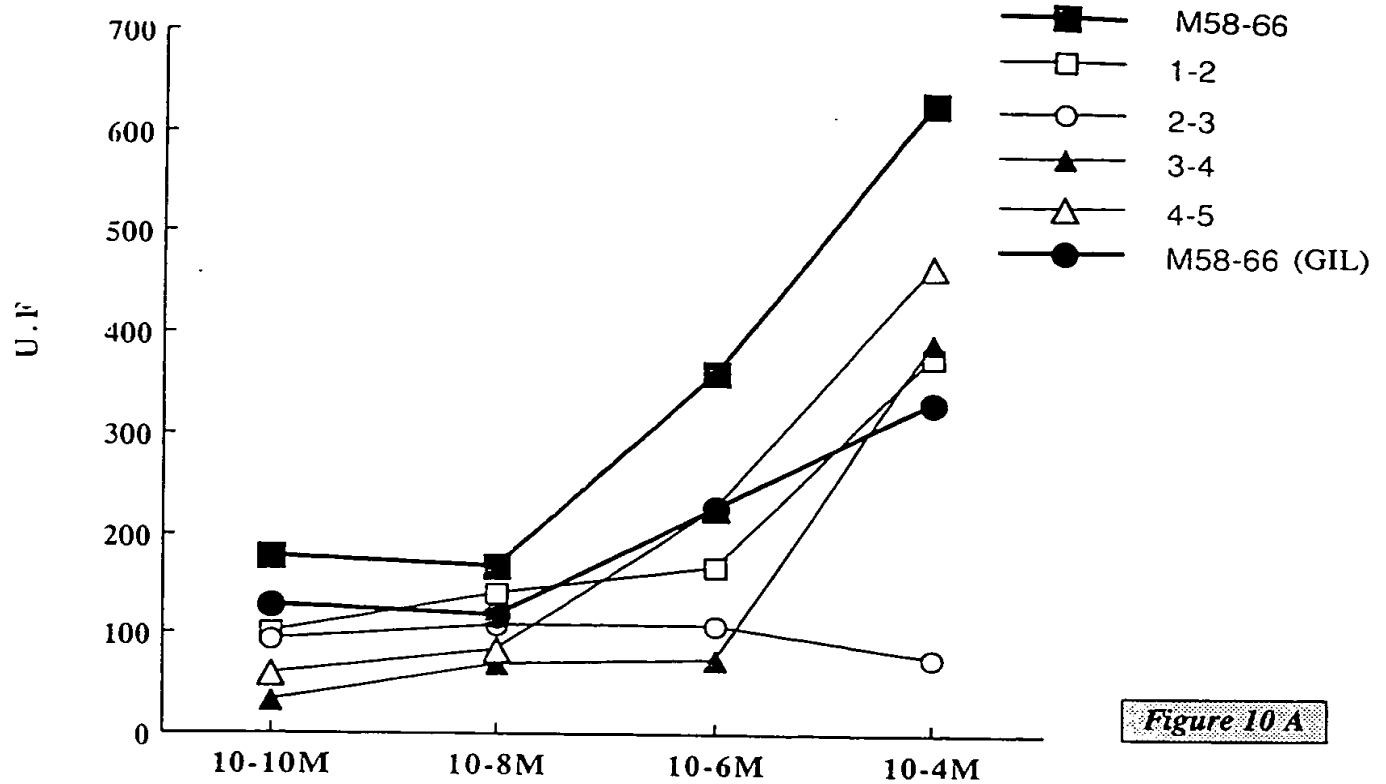


Figure 10 A

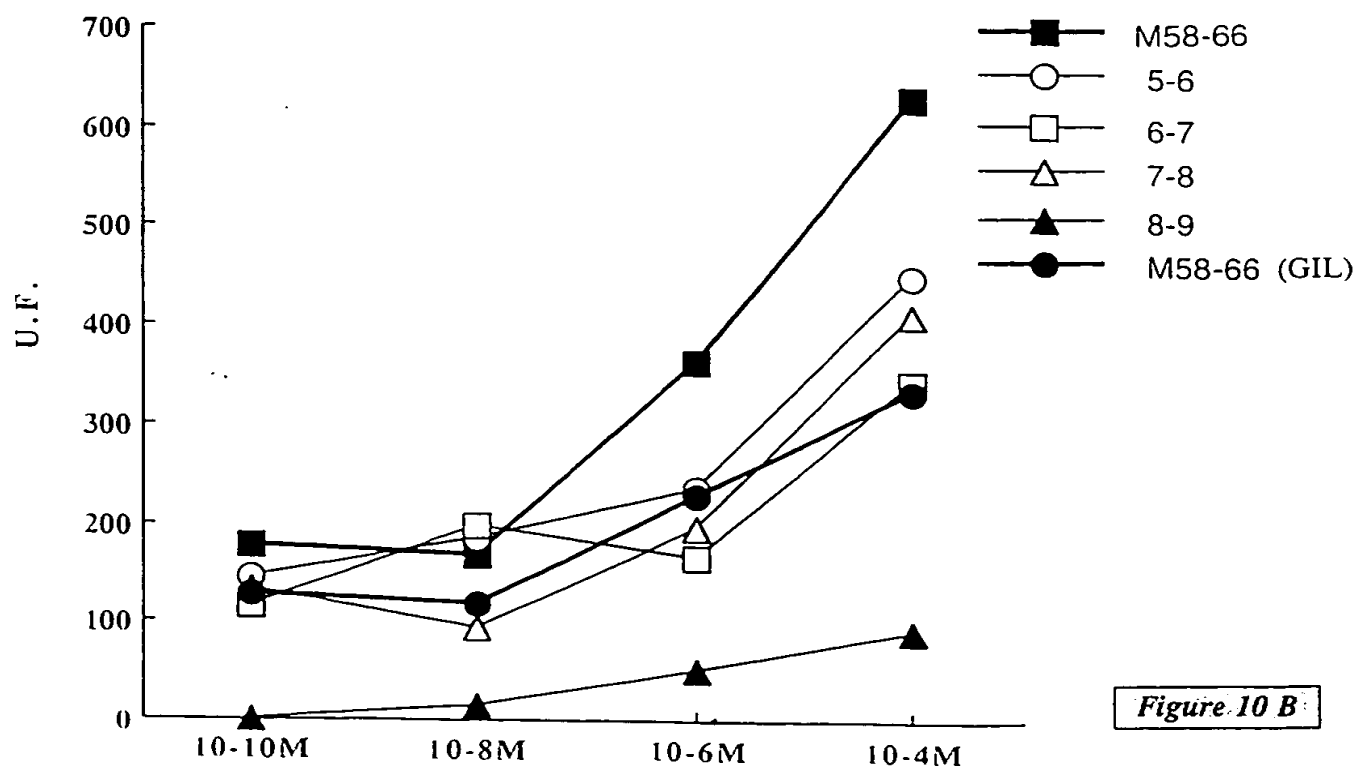


Figure 10 B

Figure 11

peptides matrice réduits

